

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

октябрь–декабрь
2016, том 6

№ 4

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

Главный редактор

Тотоян Арег А. д.м.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Мокроусов И.В. д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, 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 ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
- Дозо Ч.** д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада
- Лаврентьева И.Н.** д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 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, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 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 Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
- Михайлов М.И.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, 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, член-корреспондент РАН, директор ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
- Тотоян Артем А.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Фрейдлин И.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Хаитов 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, 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, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия |
| Вишневский Б.И. | д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия |
| Долгушин И.И. | д.м.н., профессор, академик 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, 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 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 МЗ 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 Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия |
| Нарвская О.В. | д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия |
| Савичева А.М. | д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия |
| Сельков С.А. | д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, 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 |
| Чекнев С.Б. | д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 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.б.н. (Санкт-Петербург)

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

Учредители

Северо-Западное отделение медицинских наук
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.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77–64788 от 02 февраля 2016 г.

Электронная версия журнала: www.iimmun.ru и 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

С 2016 года включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI), интегрированную с платформой Web of Science

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

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

Подписано в печать 09.12.2016 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1364

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2016
© НИИЭМ имени Пастера, 2016
© СПб РО РААКИ, 2016

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

October–December

2016, volume 6

No. 4

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

Editor-in-chief

Areg A. Totolian PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy editor-in-chief

Igor V. Mokrousov PhD, MD (Biology), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Russian Federation

Members of editorial board

Alexander S. Apt PhD, MD (Biology), Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation

Luis Barbeito PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Director, Montevideo, Uruguay

Paul Brey PhD, MD (Biology), Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos

Charles M. Dozois PhD, MD (Biology), Professor, INRS — Institute Armand Frappier, Director, Quebec, Canada

Alexander L. Gintsburg PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation

Irina N. Lavrentieva PhD, MD (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation

Yuri V. Lobzin PhD, MD (Medicine), 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 (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, M.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Menelaos N. Manoussakis Hellenic Pasteur Institute, Director, Athens, Greece

Nikolai V. Medunitsyn PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation

Michael I. Michailov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Microbiology and Virology, Moscow, Russian Federation

Hristo Najdenski PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Stephan Angeloff, Director; Department of Infectious Microbiology, Head, Sofia, Bulgaria

Gennadiy G. Onishchenko PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Assistant to the Chairman of the Government of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Vadim V. Pokrovskiy PhD, MD (Medicine), 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 (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Dakar, Director, Dakar, Senegal

Andrei S. Simbirtsev PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russian Federation

Artem A. Totolian PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Irina S. Freidlin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology, Scientific Adviser, Moscow, Russian Federation

Valery A. Chereshev PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Director, Yekaterinburg, Russian Federation

Members of editorial council

| | |
|------------------------------|---|
| Vladimir A. Aleshkin | PhD, MD (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation |
| Oleg V. Bukharin | PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Director, Orenburg, Russian Federation |
| Boris I. Vishnevsky | PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation |
| Ilija I. Dolgushin | PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, Rector, Moscow, Russian Federation |
| Vitaly V. Zverev | PhD, MD (Biology), 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 (Medicine), 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 (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation |
| Kirill P. Kashkin | PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Head of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation |
| Olga I. Kubar | PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation |
| Victor V. Maleev | PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Deputy Director on Science, Moscow, Russian Federation |
| Olga V. Narvskaya | PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation |
| Alevtina M. Savicheva | PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation |
| Sergei A. Selkov | PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation |
| Viktor V. Tets | PhD, MD (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, St. Petersburg, Russian Federation |
| Susanna M. Kharit | PhD, MD (Medicine), Professor, Institute of Childhood Infections, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation |
| Galina Ya. Tseneva | PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Bacterial Respiratory Infections, St. Petersburg, Russian Federation |
| Sergei B. Cheknev | PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation |
| Vyacheslav V. Shkarin | PhD, MD (Medicine), 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 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

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media

Certificate of registration PI no. FS 77-64788 from February, 02, 2016

Electronic version: www.iimmun.ru and 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

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

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

Produced at the Beresta Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,

Koli Tomchaka str., 28.

Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 09.12.2016. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 12.

Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2016

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2016

© SPb RAACI, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Шпынов С.Н.

| | |
|---|-----|
| « <i>CANDIDATUS MIDICHLORIA MITOCHONDRII</i> » – НОВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ПОРЯДКА <i>RICKETTSIALES</i> , ЭНДОСИМБИОНТ КЛЕЩЕЙ <i>Ixodes ricinus</i> | 315 |
|---|-----|

Полищук Н.Н., Камышный А.М.

| | |
|---|-----|
| ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА НА ПРОГРЕССИЮ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ | 325 |
|---|-----|

Оригинальные статьи

Афиногенова А.Г., Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Мадай Д.Ю.

| | |
|--|-----|
| ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ИНГИБИТОРА МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ <i>IN VITRO</i> | 335 |
|--|-----|

Малахов И.С., Аль-Шехадат Р.И., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.

| | |
|--|-----|
| СОЗДАНИЕ ИММУНОГЕНА ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА L2E7..... | 345 |
|--|-----|

Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.И., Тотолян Арег А.

| | |
|---|-----|
| ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КОРИ В ОТДЕЛЬНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ В РАМКАХ ГЛОБАЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ. СООБЩЕНИЕ 1 | 353 |
|---|-----|

Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А.

| | |
|--|-----|
| ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ПЕРВИЧНЫХ ДОНОРОВ В Г. АСТАНА, КАЗАХСТАН | 359 |
|--|-----|

Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Лаптева А.М.

| | |
|---|-----|
| КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА ПРИ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ | 366 |
|---|-----|

Краткие сообщения

Свиштунов С.А., Кузин А.А., Суборова Т.Н., Жарков Д.А.

| | |
|--|-----|
| ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ ТЯЖЕЛЫХ ТРАВМ | 373 |
|--|-----|

Кожухова Е.А., Андреева Н.В., Иващенко В.Д.

| | |
|--|-----|
| ЭТАПНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ ДИАРЕЙ ДЛЯ ВЕРИФИКАЦИИ ДИАГНОЗА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ..... | 379 |
|--|-----|

Ковалевич Н.И., Саркисян Н.С., Ракитина Е.Л., Галяс В.А., Санникова И.В., Махиня О.В.

| | |
|--|-----|
| ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ БРУЦЕЛЛЕЗОМ | 384 |
|--|-----|

Методы

Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Круглов А.Н., Рябченко И.В., Детушев К.В., Морозова Т.П., Шепелин А.П.

| | |
|---|-----|
| СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ | 389 |
|---|-----|

Гурьев А.С., Кузнецова О.Ю., Пясецкая М.Ф., Смирнова И.А., Беляева Н.А., Вербов В.Н., Волков А.Ю.

| | |
|--|-----|
| БЫСТРЫЙ СКРИНИНГ МОЧИ НА БАКТЕРИУРИЮ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА, СОВМЕЩАЮЩЕГО В СЕБЕ МЕТОДЫ ФОТОМЕТРИИ И КОГЕРЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ НЕФЕЛОМЕТРИИ | 395 |
|--|-----|

Юбилей

| | |
|--|-----|
| К 75-ЛЕТИЮ ГАЛИНЫ ЯКОВЛЕВНЫ ЦЕНЕВОЙ..... | 399 |
|--|-----|

| | |
|---------------------------|-----|
| Правила для авторов | 401 |
|---------------------------|-----|

| | |
|---------------------------|-----|
| Авторский указатель | 404 |
|---------------------------|-----|

| | |
|----------------------------|-----|
| Предметный указатель | 404 |
|----------------------------|-----|

CONTENTS

Reviews

Shpynov S.N.

| | |
|--|-----|
| « CANDIDATUS MIDICHLORIA MITOCHONDRII »: A NEW MEMBER OF ORDER <i>RICKETTSIALES</i> , ENDOSYMBIONT OF <i>IXODES RICINUS</i> TICK | 315 |
|--|-----|

Polishchuk N.N., Kamyshny A.M.

| | |
|---|-----|
| EFFECT BY INTESTINAL MICROBIOM ON THE PROGRESSION OF VIRAL HEPATITIS | 325 |
|---|-----|

Original articles

Afinogenova A.G., Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Maday D.Yu.

| | |
|---|-----|
| THE NEW METALL-BETA-LACTAMASE'S INHIBITOR EFFICACY IN A MODEL SYSTEM <i>IN VITRO</i> | 335 |
|---|-----|

Malakhov I.S., Al-Shehadat R.I., Duckhovlinov I.V., Simbirtsev A.S.

| | |
|--|-----|
| HUMAN PAPILLOMA VIRUS IMMUNOGEN CREATION ON THE BASE OF CHIMERIC RECOMBINANT PROTEIN L2E7 | 345 |
|--|-----|

*Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A.,
Boiro M.Y., Totolian Areg A.*

| | |
|--|-----|
| MEASLES VIRUS IMMUNITY LEVEL STUDY IN PARTICULAR POPULATION GROUPS OF THE REPUBLIC OF GUINEA WITHIN THE FRAMEWORK OF GLOBAL MEASLES ELIMINATION PROGRAM. REPORT 1 | 353 |
|--|-----|

Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T.N., Totolian Areg A.

| | |
|--|-----|
| GENETIC VARIANTS OF HEPATITIS B VIRUS IN PRIMARY DONORS IN ASTANA, KAZAKHSTAN | 359 |
|--|-----|

Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Lapteva A.M.

| | |
|--|-----|
| NASAL MUCOUS MEMBRANE MICROFLORA IN PATIENTS WITH POLYPOUS RHINOSINUSITIS | 366 |
|--|-----|

Short communications

Svistunov S.A., Kuzin A.A., Suborova T.N., Zharkov D.A.

| | |
|---|-----|
| MICROBIOLOGICAL METHODS APPLICATION EXPERIENCE IN THE SEVERE INJURIES INFECTIOUS COMPLICATIONS | 373 |
|---|-----|

Kozhukhova E.A., Andreeva N.V., Ivaschenko V.D.

| | |
|--|-----|
| OPEN ENDED RESULTS OF ACUTE DIARRHEA AGENT DETECTION TO VERIFY DIAGNOSIS IN ADULT CASES | 379 |
|--|-----|

Kovalevich N.I., Sarkisyan N.S., Rakitina E.L., Galyas V.A., Sannikova I.V., Makhinya O.V.

| | |
|---|-----|
| THE INFLUENCE OF PATHOGENETIC THERAPY ON THE LEVER OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH ACUTE BRUCELLOSIS | 384 |
|---|-----|

Methods

Podkopaev Ya.V., Domotenko L.V., Kruglov A.N., Ryabchenko I.V., Detushev K.V., Morozova T.P., Shepelin A.P.

| | |
|--|-----|
| COMPARATIVE EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR PATHOGEN ISOLATION OF PURULENT BACTERIAL MENINGITIS | 389 |
|--|-----|

Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Pyasetskaya M.F., Smirnova I.A., Belyaeva N.A., Verbov V.N., Volkov A.Yu.

| | |
|--|-----|
| RAPID URINE SCREENING FOR BACTERIURIA IN CHILDREN USING MICROBIOLOGY ANALYZER, COMBINING PHOTOMETRIC AND COHERENT FLUCTUATION NEPHELOMETRIC METHODS | 395 |
|--|-----|

Jubilee

| | |
|--|-----|
| FOR THE ANNIVERSARY OF PROFESSOR GALINA YA. TSENEVA | 399 |
|--|-----|

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Instructions to Authors | 401 |
|--------------------------------------|-----|

| | |
|---------------------------|-----|
| Author index | 404 |
|---------------------------|-----|

| | |
|----------------------------|-----|
| Subject index | 404 |
|----------------------------|-----|

«*CANDIDATUS MIDICHLORIA MITOCHONDRII*» — НОВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ПОРЯДКА *RICKETTSIALES*, ЭНДОСИМБИОНТ КЛЕЩЕЙ *IXODES RICINUS*

С.Н. Шпынов

ФГБУ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ,
Москва, Россия

Резюме. Эндосимбионт иксодовых клещей *Ixodes ricinus* «*Candidatus Midichloria mitochondrii*» единственная из известных бактерий, которая может вторгаться и существовать внутри митохондрий животных. Ее хозяин — иксодовый клещ *I. ricinus*, является переносчиком возбудителей важных природно-очаговых заболеваний человека. «*Candidatus M. mitochondrii*» обнаружена в межмембранном пространстве митохондрий и в цитоплазме овариальных клеток у 100% самок *I. ricinus*. При локализации в слюнных железах клещей бактерия содержит жгутик. «*Candidatus M. mitochondrii*» имеет две группы генов (*cbb3* цитохром оксидазу и флагеллин) уникальных для представителей порядка *Rickettsiales*, что позволяет ей играть важную роль в эмбриогенезе клещей *I. ricinus* и вызывать сероконверсию у 58% пациентов с присасыванием этого вида клещей в анамнезе. Недавно в порядке *Rickettsiales* было предложено выделить семейство «*Candidatus Midichloriaceae*» и внутри него род «*Candidatus Midichloria*», получившие названия в честь «*Candidatus M. mitochondrii*». Эта бактерия вместе с генетически близкородственными микроорганизмами образовала группу MALOs (*midichloria and like organisms*), представители которой продемонстрировали связь с широким кругом хозяев: от членистоногих до инфузорий, амёб, губок, рыб, различных животных и человека. В настоящее время отсутствуют данные о возможности репликации «*Candidatus M. mitochondrii*» в организме человека и патогенности этого микроорганизма. Несмотря на высокий процент серопозитивных проб, полученных от лиц с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе, эту бактерию пока нельзя рассматривать как ответственную за патологию человека по примеру известных патогенных представителей порядка *Rickettsiales* (риккетсии, анаплазмы и эрлихии). Требуется пересмотреть отношение к иммунному ответу к слюне *I. ricinus* с учетом потенциального воздействия «*Candidatus M. mitochondrii*». Следует рассматривать высокую возможность роли этой бактерии в иммунном ответе и иммуномодуляции у человека с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе. ДНК «*Candidatus M. mitochondrii*» была впервые генотипирована в клещах *I. ricinus* на территории Европейской части Российской Федерации.

Ключевые слова: «*Candidatus Midichloria mitochondrii*», эндосимбионт, группа MALOs (*midichloria and like organisms*), порядок *Rickettsiales*, иксодовые клещи, *Ixodes ricinus*, митохондрия.

Адрес для переписки:

Шпынов Станислав Николаевич
123098, Россия, Москва, ул. Н.Ф. Гамалеи, 18, ФГБУ ФНИЦ
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (499) 193-61-85 (служебн.).
E-mail: stan63@inbox.ru

Contacts:

Stanislav N. Shpynov
123098, Russian Federation, Moscow, N.F. Gamaleya str., 18,
N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology.
Phone/fax: +7 (499) 193-61-85 (office).
E-mail: stan63@inbox.ru

Библиографическое описание:

Шпынов С.Н. «*Candidatus Midichloria mitochondrii*» — новый представитель порядка *Rickettsiales*, эндосимбионт клещей *Ixodes ricinus* // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 315–324. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-315-324

Citation:

Shpynov S.N. «*Candidatus Midichloria mitochondrii*»: a new member of order *Rickettsiales*, endosymbiont of *Ixodes ricinus* tick // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 315–324. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-315-324

«*Candidatus Midichloria mitochondrii*»: A NEW MEMBER OF ORDER *Rickettsiales*, ENDOSYMBIONT OF *Ixodes ricinus* TICK

Shpynov S.N.

N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. «*Candidatus Midichloria mitochondrii*» is the sheep tick *Ixodes ricinus* endosymbiont. This unique bacteria can occupy and persist within the mitochondria of animals. *I. ricinus* is an important vector of human pathogens in natural focal of infections. «*Candidatus M. mitochondrii*» found in the intermembrane space of mitochondria and in the cytoplasm of ovarian cells in 100% females of *I. ricinus*. The bacteria contain flagella in the salivary glands of ticks. «*Candidatus M. mitochondrii*» has two groups of unique genes for the members of the order *Rickettsiales* (cbb3 cytochrome oxidase and flagellin), which allows it to play an important role in embryogenesis of the *I. ricinus* ticks and cause seroconversion in 58% of patients after ticks bloodsucking. This bacterium formed MALOs group (midichloria and like organisms) with genetically closely related organisms which demonstrated a association with a wide range of host from arthropods to ciliates, amoebae, sponges, fish and various animals and humans. Now there is no data about replication the «*Candidatus M. mitochondrii*» in humans and pathogenicity of this microorganism. Although a high percentage of seropositive samples obtained from patients after bloodsucking of *I. ricinus* in anamnesis, this bacterium cannot yet be regarded as responsible for the pathology as known human pathogenic from order *Rickettsiales* (*Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp.). Needed to reconsider the attitude to an immune response to the saliva of *I. ricinus*, taking into account the potential impact of «*Candidatus M. mitochondrii*». It is considered highly possible role of this bacterium in the immune response and immunomodulation in humans with bloodsucking of *I. ricinus* in anamnesis. DNA of «*Candidatus M. mitochondrii*» was the first time detected in *I. ricinus* ticks from European part of Russia.

Key words: «*Candidatus Midichloria mitochondrii*», endosymbiont, MALOs (midichloria and like organisms), order *Rickettsiales*, ticks, *Ixodes ricinus*, mitochondria.

Введение

Применение молекулярно-биологических методов в последние десятилетия привело к описанию новых видов риккетсий, включая патогенные для человека виды [27], а также некультивируемых в лабораторных условиях микроорганизмов из порядка *Rickettsiales* [6, 14, 15, 22, 39, 44], которые в соответствии с рекомендациями ICSB (International Committee of Systematic Bacteriology) были классифицированы как «*Candidatus sp.*» [24]. Эндосимбионт иксодовых клещей *Ixodes ricinus* «*Candidatus Midichloria mitochondrii*» требует особого внимания со стороны исследователей, так как является единственной из известных в настоящее время бактерий, которая была обнаружена внутри митохондрий животных [4, 34, 36]. Несмотря на высокий процент (58%) серопозитивных проб с ее рекомбинантным антигеном у лиц с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе, этот микроорганизм пока нельзя рассматривать ответственным за патологию человека по примеру известных патогенных представителей порядка *Rickettsiales* (риккетсии, анаплазмы и эрлихии). Но возможно потребуются пересмотреть отношение к иммунному ответу к слюне *I. ricinus* с учетом потенциального воздействия «*Candidatus M. mitochondrii*».

Цель обзора привлечь внимание исследователей и практикующих врачей (инфекционистов и других специалистов) к «*Candidatus M. mitochondrii*» для изучения ее распространения на территории Российской Федерации и возможной роли в патологии человека.

История изучения

Первая информация о наличии риккетсиоподобных микроорганизмов в ооплазме и митохондриях развивающихся ооцитов в яичниках самок иксодовых клещей *I. ricinus* (Linnaeus, 1758) была получена при ультраструктурном изучении возбудителя клещевой лихорадки (tick-borne fever) [16].

Международной группой исследователей из лаборатории Средиземноморского университета (Марсель, Франция), возглавляемой профессором Д. Раулем, были проведены исследования клещей рода *Ixodes*, снятых с пациентов без симптомов какого-либо заболевания, в провинции Беллуно на севере Италии в период 1998–2001 гг. Помимо ДНК риккетсий, боррелий, эрлихий и анаплазм в клещах *I. ricinus* впервые был сиквенирован фрагмент гена 16S рРНК (1389 п.о.) некультивируемого микроорганизма, отнесенного к порядку *Rickettsiales* — *Rickettsiales bacterium It86*

(GenBank number AF525482) [35]. Впоследствии на основании результатов филогенетического анализа генов 16S рРНК и *gyrB*, результатов электронно-микроскопических исследований и других данных эта бактерия была описана под названием «*Candidatus* M. mitochondrii» [4, 34, 36].

Цикл научных работ, выполненных исследователями из разных стран в последующее десятилетие, позволил описать генотипические и фенотипические характеристики «*Candidatus* M. mitochondrii», что представлено в обзоре.

Классификация и номенклатура

В соответствии с руководящими принципами ICSB, бактерии было присвоено название «*Candidatus* M. mitochondrii» в связи с тем, что некультивируемые микроорганизмы могут быть классифицированы только как кандидаты в новый вид [24]. Родовое название *Midichloria* произошло от наименования микроскопических симбионтов клеток живых существ — «midichlorians» из фантастического фильма «Звездные Войны» Джорджа Лукаса, образованного от слияния двух терминов: «mitochondrion» и «chloroplast» [36]. Видовое название «mitochondrii» связано с уникальным внутримитохондриальным обитанием микроорганизма.

На основании результатов изучения последовательностей гена 16S рРНК филогенетическая позиция «*Candidatus* M. mitochondrii» была установлена в порядке *Rickettsiales* класса *Alphaproteobacteria* типа *Proteobacteria* [36]. Бактерии группы MALOs (midichloria and like organisms), филогенетически близкие с «*Candidatus* M. mitochondrii», продемонстрировали связь с широким кругом хозяев: от членистоногих (клещи, блохи, клопы и жуки) до инфузорий, амёб, губок, рыб и различных животных, включая человека [1, 6, 10, 17, 19, 21, 23, 44]. При изучении последовательностей гена 16S рРНК группа MALOs образовала монофилетическую группу, структурированную на отдельные подгруппы (клады), которые могут представлять новые рода, и заняла позицию на уровне описанных семейств из порядка *Rickettsiales*, что привело к предложению выделить новое семейство — «*Candidatus* Midichloriaceae» [23]. Геноварианты, штаммы и близкородственные «*Candidatus* M. mitochondrii» микроорганизмы выявлены в иксодовых клещах на разных континентах [5, 9, 45].

В настоящее время в семействе «*Candidatus* Midichloriaceae» выделено несколько родов «*Candidatus* Midichloria», «*Candidatus* Lariskella»,

«*Candidatus* Anadelfobacter», «*Candidatus* Defluviella» и недавно описанный вид «*Candidatus* Fokinia solitaria», претендующий на статус рода [42].

Морфология, внутриклеточная локализация и ультраструктура

С помощью электронной микроскопии установлено, что «*Candidatus* M. mitochondrii» — бактерия овальной или кокковидной формы размером 0,45 мкм в диаметре и 1,2 мкм в длину [4]. Это единственный представитель порядка *Rickettsiales*, имеющий жгутик [20].

«*Candidatus* M. mitochondrii» выявлена в мембранном пространстве митохондрий и в цитоплазме овариальных клеток (ооцитах) у 100% самок *I. ricinus* [4, 34, 36]. При исследовании самцов *I. ricinus* данный микроорганизм выявлен в 44% случаев. Бактерии отсутствовали в митохондриях ооцитов самок *I. holocyclus* при исследовании в электронном микроскопе [5].

При детальном рассмотрении ооцитов в яичнике половозрелых самок *I. ricinus* с помощью электронной микроскопии, «*Candidatus* M. mitochondrii» может находиться как в цитоплазме клеток-хозяина, так и внутри митохондрий [4]. При локализации в цитоплазме с «*Candidatus* M. mitochondrii» окружены тремя мембранами: наружной, представленной мембраной клетки хозяина, и двумя внутренними, типичными для грамтрицательных бактерий. Внутри митохондрий бактерии окружены митохондриальным матриксом, содержащим рибосомы, нити ДНК и дыхательные ферменты.

«*Candidatus* M. mitochondrii» выявлена с помощью FISH-детекции в активно функционирующих митохондриях *I. ricinus*, в отмерших органеллах и в митохондриях, функции которых ингибированы [8]. Количество «*Candidatus* M. mitochondrii» в митохондриях варьирует от 1 до 20 клеток и более [34]. Электронная микроскопия позволила установить факт прогрессирующей дегградации митохондриального матрикса клетки-хозяина при размножении в ней «*Candidatus* M. mitochondrii». Митохондрии, в которых содержится большое количество бактерий, выглядят раздутыми с критическим уменьшением митохондриального матрикса.

Применение антител к рекомбинантному жгутиковому флагеллину (FliD) «*Candidatus* M. mitochondrii» позволило установить наличие жгутика у бактерий при их локализации в слюнных железах *I. ricinus* [20]. Однако

электронная микроскопия не позволила обнаружить доказательств наличия жгутика у «*Candidatus M. mitochondrii*» при ее находении в клетках яичников у самок *I. ricinus*, собранных в природе [34, 46].

Применение полного протокола FISH-детекции в клещах с использованием Су3- и Су5-меченых зондов позволило точно и селективно определить локализацию эндосимбионта на всех этапах жизненного цикла клеща *I. ricinus* [8]. При нахождении «*Candidatus M. mitochondrii*» в митохондриях происходило наложение сигналов.

Жизненный цикл

Жизненный цикл «*Candidatus M. mitochondrii*» недостаточно изучен. Бактерия выявлена у самок *I. ricinus* в двух формах: со жгутиком и без жгутика. Эндосимбионт «*Candidatus M. mitochondrii*» содержится в яичниках самок *I. ricinus*, при этом возможно принимает участие в оогенезе [38] и передается горизонтально. Жгутик при такой локализации отсутствует [34, 46]. Содержание «*Candidatus M. mitochondrii*» в митохондриях ооцитов не сказывается на нормальном развитии последних, что предполагает транс-овариальную передачу микроорганизма [34]. При выявлении «*Candidatus M. mitochondrii*» в слюнных железах *I. ricinus* бактерия содержит жгутик и, возможно, вертикально передается позвоночным хозяевам [9]. Доказательством инокулятивной передачи бактерий рода *Midichloria* во время присасывания *I. ricinus* может являться детекция 16S рРНК близкородственных «*Candidatus M. mitochondrii*» бактерий в крови позвоночных: косуль, лошадей, крупного рогатого скота, овец и собак [3, 41]. Выявление в ИФА (ELISA) антител к рекомбинантному жгутиковому флагеллину (rFliD) «*Candidatus M. mitochondrii*» в сыворотках крови человека и собак указывает на его попадание в организм млекопитающих [3, 19]. Предполагается, что жгутик может играть активную роль в инвазии «*Candidatus M. mitochondrii*» в митохондрии клетки хозяина и сбрасываться впоследствии бактерией, внедрившейся в периплазму по аналогии с *Bdellovibrio bacteiovorus* [30].

Установлено, что размножение и гибель «*Candidatus M. mitochondrii*» коррелируют с фазами кормления и голодания *I. ricinus*, сопровождающимися метаморфозы хозяина. По данным метода ПЦР в реальном времени максимальное накопление бактерий ($7,9 \times 10^7$)

определено в период после кормления самок и кладки яиц, что связано с продукцией метаболитов для ооцитов хозяина, минимальное ($2,48 \times 10^4$) — у личинок в период линьки [37]. Применение тетрациклина в эксперименте не позволяет избавиться *I. ricinus* от симбионта «*Candidatus M. mitochondrii*», но снижает размножение бактерий [25].

Таким образом, жгутик «*Candidatus M. mitochondrii*» не обнаруживается в овариальных клетках самок *I. ricinus*, выявляется только в клетках слюнных желез, а антитела к его рекомбинантному флагеллину определяются в сыворотке крови млекопитающих. Все это дает возможность предположить существование двух форм «*Candidatus M. mitochondrii*»: симбиотической, связанной с оогенезом хозяина (горизонтальная передача), и паразитической, связанной с локализацией в слюнных железах клещей и возможной трансмиссией млекопитающим (вертикальная передача).

Экология и географическое распространение

«*Candidatus M. mitochondrii*» экологически связана с клещом *I. ricinus*, который является важнейшим переносчиком этиологических агентов бактериальных, вирусных и протозойных зоонозных инфекций в Европе. В *I. ricinus* выявлены вирус клещевого энцефалита, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens*, *B. venatorum*, *B. microti*, *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, «*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*», *Francisella tularensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* [18, 28, 31, 32].

«*Candidatus M. mitochondrii*», наряду с близкородственными ей бактериями, распространена в иксодовых клещах в Западной Европе, Северной Америке и Австралии. Выявлена генетическая гетерогенность «*Candidatus M. mitochondrii*» как среди различных видов разных родов иксодовых клещей, так и среди особей одного вида клещей. Микроорганизмы, близкородственные «*Candidatus M. mitochondrii*», генотипированы у 8 видов клещей (*Rhipicephalus turanicus*, *Rh. sanguineus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum*, *H. truncatum*, *Amblyomma tuberculatum*, *I. uriae* и *I. frontalis*) из 5 родов иксодовых клещей, за исключением представителей рода *Dermacentor*, собранных в Италии, Исландии, Испании, Израиле и США [9, 13, 26]. Три геноварианта «*Candidatus M. mitochondrii*» выявлены в клещах *A. americanum* в восточной части США [45]. Два штамма «*Candidatus M. mitochondrii*»

генотипированы в клещах *I. holocyclus*, собранных с человека, животных и растительности на восточном побережье Австралии [5].

При изучении микробиома половозрелых (♀, ♂) особей и нимф *A. americanum*, собранных в Северной Каролине (США), среди представителей порядка *Rickettsiales* были генотипированы «Candidatus Rickettsia amblyommii», «Candidatus M. mitochondrii», *Ehrlichia chaffeensis*, а также геноварианты «Candidatus Rickettsia amblyommii», «Candidatus M. mitochondrii» и *Rickettsia massiliae* [29]. Однако обильное содержание эндосимбионта «Candidatus M. mitochondrii» в членистоногом ограничивает возможность детекции патогенных микроорганизмов (*B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. duttonii*, *R. rickettsia*, *B. henselae*, *E. chaffeensis* и *A. phagocytophilum*) с использованием универсальных праймеров при изучении 16S профиля на основе полимеразной цепной реакции [11], что искажает представление о их присутствии в тканях хозяина. Эта бактерия доминировала над *A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp. и *Rickettsia* spp. при исследовании *I. ricinus* в Норвегии [12]. «Candidatus M. mitochondrii» и *A. phagocytophilum* генотипированы в *I. frontalis*, снятом с крупного рогатого скота в Испании [26].

Культивирование

В настоящее время «Candidatus M. mitochondrii» относится к некультивируемым (в лабораторных условиях) формам бактерий. Отсутствуют данные о ее культивировании на искусственных питательных средах, в культуре клеток, развивающихся куриных эмбрионах и в организме лабораторных животных.

Важным инструментом для моделирования фенотипических характеристик «Candidatus M. mitochondrii» как некультивируемого вида прокариот, обитающего внутри митохондрий, является биоинформационный анализ его полноразмерного генома.

Геном и генотипические характеристики

Полноразмерный геном «Candidatus M. mitochondrii» IricVA (GenBank: RefSeq NC_015722.1; INSDC CP002130.1) сиквенирован из тканей яичника самки *I. ricinus* (место сбора — Варез, Италия). Геном представлен одной кольцевой хромосомой размером 1183732 п.о., плазмиды отсутствуют, содержание G+C 36,6%, [38]. Геном содержит 1246 генов, кодирующих 1161 белок, и включает 3 рРНК, 35 тРНК и 46 псевдогенов (GenBank: RefSeq NC_015722.1).

Как и у риккетсий, геном «Candidatus M. mitochondrii» имеет гены, кодирующие белки секреторной системы IV типа и Sec-независимой системы секреции белка, анкириновые белковые повторы и различные мембранные белки, что позволяет симбионту проникать в митохондрии клетки хозяина.

Важную роль в жизненном цикле «Candidatus M. mitochondrii» играют 2 группы генов, отсутствующие у других представителей порядка *Rickettsiales*: гены кодирующие *cbb₃*, цитохромоксидазу и кодирующие флагеллин [38]. Наличие *cbb₃* цитохромоксидазы позволяет «Candidatus M. mitochondrii» синтезировать АТФ при концентрациях кислорода, субоптимальных для митохондрий. Предполагается, что эндосимбионт «Candidatus M. mitochondrii» служит дополнительным источником АТФ для овариальных клеток самки *I. ricinus* во время оогенеза. Передача АТФ хозяйской клетке может осуществляться с помощью АТФ/АДФ-транслоказы бактерии, белки этого семейства имеют обратимые функции, основанные на концентрации АТФ/АДФ и протонном градиенте [38].

Геном «Candidatus M. mitochondrii» содержит группу из 26 генов, которые кодируют все компоненты жгутика, включая крючок, филламент и базальное тело, чего нет в изученных геномах 20 других видов риккетсий. Отсутствуют признаки, того что флагеллярные гены являются псевдогенами или произошли с помощью горизонтального переноса генов [38]. Считается, что они находились у общего предка *Rickettsiales* и митохондрий и были утрачены при переходе от свободноживущего состояния к внутриклеточному [43].

В настоящее время результаты изучения генома «Candidatus M. mitochondrii» не позволяют получить ответ, принимает ли бактерия участие в мутуалистических или паразитических взаимоотношениях со своим хозяином — иксодовым клещом *I. ricinus*.

Биохимические свойства

Биохимические свойства «Candidatus M. mitochondrii» смоделированы при анализе генома, который обладает относительным дефицитом генов, кодирующих пути биосинтеза аминокислот и нуклеотидов, по сравнению с родственными свободноживущими α -протеобактериями. Он содержит набор генов для синтеза коэнзима А, биотина, липоевой кислоты, тетрагидрофолата, пантотената, гема, убихинона и может поставлять клеткам хозяина эти основные кофакторы [38]. Микроорганизм имеет цикл Кребса, глюконеогенез, комплекс пируватдеги-

дрогеназы и почти все ферменты, необходимые для гликолиза. «*Candidatus M. mitochondrii*» способна синтезировать АТФ и АТФ/АДФ-транслоказу, что дает возможность осуществлять импорт/экспорт АТФ по отношению к клетке-хозяину.

Антигенные свойства

В свете имеющихся на сегодняшний день знаний о «*Candidatus M. mitochondrii*», бактерии следует рассматривать как пакет антигенов, инокулированных в организм человека и животных, после присасывания клеща *I. ricinus* [3].

«*Candidatus M. mitochondrii*» имеет гены, кодирующие поверхностные белки: фактор сборки белка наружной мембраны BamA, предшественник поверхностного антигена; компоненты жгутика, включая крючок, филамент и базальное тело [38]. Кроме того, имеется ген, кодирующий периплазматический протеин LptC, связанный с липополисахаридом (LPS).

Таким образом, в геноме «*Candidatus M. mitochondrii*» присутствуют гены, кодирующие белки, присущие трем основным видам бактериальных антигенов (соматические, жгутиковые и поверхностные).

Эпизоотологические и эпидемиологические особенности

В настоящее время отсутствует прямое подтверждение эпизоотологических и эпидемиологических проявлений связанных с «*Candidatus M. mitochondrii*».

Вертикальная передача «*Candidatus M. mitochondrii*» позвоночным хозяевам может быть обусловлена локализацией бактерии в слюнных железах *I. ricinus*, где она присутствует в форме, содержащей жгутик [9, 19, 20].

Возможность трансмиссии клещами представителей рода «*Candidatus Midichloria*» млекопитающим продемонстрирована секвенированием семи вариантов последовательности гена 16S рНК в 26 (16,66%) пробах при исследовании в ПЦР образцов цельной крови 156 животных (лошадей, коров, овец и собак) с высоким риском присасывания клещей из различных регионов Италии [3]. Связь этих генотипов с иксодовыми клещами подтверждена их кластеризацией в филогенетическом древе с последовательностями изолятов, ранее генотипированных в иксодовых клещах. В образцах крови 50 животных контрольной группы (коровы и собаки) с низким риском присасывания клещей положительные ПЦР-пробы

отсутствовали. Последовательность гена 16S «*Candidatus M. mitochondrii*» была амплифицирована при скрининге бактерий, передающихся клещами, в крови косуль в Дании [41].

Инокуляция антигена «*Candidatus M. mitochondrii*» животным во время кровопитания *I. ricinus* подтверждена выявлением антител к рекомбинантному жгутиковому флагеллину FliD в ELISA в 26,6% случаев при исследовании 218 собак из 16 мест содержания на юге Италии с высоким риском нападения *I. ricinus* [3].

Антитела к рекомбинантному жгутиковому флагеллину rFliD «*Candidatus M. mitochondrii*» были выявлены в ELISA в сыворотках крови у 58% людей с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе, и в 1–2% у интактных доноров [19].

Лабораторная диагностика

В настоящее время отсутствуют коммерческие тест-системы для выявления ДНК «*Candidatus M. mitochondrii*» в объектах внешней среды (иксодовые клещи), в образцах клинического материала от человека и в пробах материала от животных. Отсутствуют сертифицированные серологические тест-системы для выявления антител в сыворотках пациентов с присасыванием иксодовых клещей (*I. ricinus*) в анамнезе.

При выполнении исследований целесообразно провести генотипирование (ПЦР-сиквенирование) «*Candidatus M. mitochondrii*» в иксодовых клещах, крови животных и человека в соответствии с дизайном праймеров и протоколами, рекомендованными исследователями [35, 36, 37, 41].

Применение рекомбинантного жгутикового флагеллина в качестве антигена позволило выявить в ELISA антитела к «*Candidatus M. mitochondrii*» у пациентов с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе и интактных [19]. Специфичность рекомбинантного антигена «*Candidatus M. mitochondrii*» была обусловлена отсутствием жгутика у других представителей порядка *Rickettsiales* [7]. Для исключения возможности перекрестных реакций с антигеном боррелий 80 сывороток были исследованы в Western-blot на наличие антител к *Borrelia burgdorferi* s.l. В 32 сыворотках (40%) были выявлены антитела к боррелиям, при этом 11 сывороток (13,75%) также содержали антитела к rFliD «*Candidatus M. mitochondrii*». Все 36 сывороток (45%), положительных на наличие антител к «*Candidatus M. mitochondrii*», не содержали специфических антител к *B. burgdorferi* s.l. Только в 21 сыворотке (26,25%) были выявлены антитела исключительно к *B. burgdorferi* s.l.

12 сывороток (15%) были отрицательными на антитела в отношении обеих бактерий. В сыворотках 47 пациентов (58%) были выявлены антитела к «Candidatus M. mitochondrii». Таким образом, большая часть сывороток пациентов, содержащих антитела к «Candidatus M. mitochondrii», не имела антител к *B. burgdorferi* s.l.

Диагностическая ценность этой тест-системы может быть ограничена тем, что жгутик не всегда является атрибутом микроорганизма. Необходима разработка тест-систем, основанных на выявлении антител к поверхностным белкам (антигенам) бактерии, в первую очередь, к белку наружной мембраны VamA, имеющего важное значение при взаимодействии с рецепторами клетки хозяина и мембранами митохондрий.

Выявление «Candidatus M. mitochondrii» в клещах *Ixodes ricinus* в Российской Федерации

Весной 2015 года голодные имаго иксодовых клещей *I. ricinus* (11♂; 3♀) и *I. persulcatus* (10♂; 10♀) были собраны с растительности на территории Воронежской (51° 92'N; 39° 69'E) и Иркутской областей (51° 53'40"N; 104° 50'21"E) соответственно. Клещи были идентифицированы на основании морфологических признаков [2]. Фрагменты ДНК, амплифицированные в ПЦР с праймерами к уникальной последовательности фрагмента гена *gyrB* «Candidatus M. mitochondrii» [37] и специфичными для фрагмента гена цитратсинтазы (*gltA*) известных видов риккетсий CS409d — RP1258n [33], были сиквенированы на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130.

Во всех трех пробах самок *I. ricinus* был амплифицирован фрагмент гена *gyrB* длиной 105 п.о. имеющий 100% гомологии с нуклеотидной последовательностью генома «Candidatus M. mitochondrii» IricVA (GenBank № CP002130) по позициям нуклеотидов с 1030995 по 1031099. При этом все пробы *I. ricinus* были отрицательны в ПЦР с праймерами к фрагменту гена *gltA* риккетсий. При исследовании *I. persulcatus* ни в одной из проб не была выявлена ДНК «Candidatus M. mitochondrii». При этом был сиквенирован фрагмент ДНК, имеющий 100% гомологии с геном цитратсинтазы «Candidatus Rickettsia tarasevichiae» (GenBank № AF503167). Различия в результатах, полученных при генотипировании двух представителей порядка *Rickettsiales* в клещах *I. ricinus* и *I. persulcatus*,

согласуются с данными о различном происхождении этих близкородственных видов клещей, связанном с геологическими событиями, приведшими к формированию континентов в меловой период [40].

Заключение

В настоящее время не установлена возможность репликации «Candidatus M. mitochondrii» в организме человека и патогенность этого микроорганизма. Несмотря на высокий процент серопозитивных проб, полученных от лиц с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе, эту бактерию пока нельзя рассматривать как ответственную за патологию человека по примеру известных патогенных представителей порядка *Rickettsiales*.

Требуется пересмотреть отношение к иммунному ответу к слюне *I. ricinus* с учетом возможного воздействия «Candidatus M. mitochondrii». Следует рассматривать высокую возможность роли этой бактерии в иммунном ответе и иммуномодуляции у человека с присасыванием *I. ricinus* в анамнезе. Это предположение ограничивает подобное воздействие слюны клеща на организм человека, имеющей важное значение в процессе присасывания и трансмиссии микроорганизма. Другим аспектом реализации трансмиссии «Candidatus M. mitochondrii» и/или ее антигенов после присасывания *I. ricinus* может стать развитие патологического состояния, что также требует тщательного изучения.

Наличие любого из проявлений, обусловленных воздействием «Candidatus M. mitochondrii» и/или ее антигенов на иммунную систему человека, индикатором которых служит сероконверсия, и связанных с переносчиком *I. ricinus*, предполагает наличие феномена природной очаговости.

Благодарности

Автор выражает признательность руководителю лаборатории экологии переносчиков ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ д.б.н., профессору Э.И. Коренбергу из лаборатории, которого были получены образцы суммарной ДНК иксодовых клещей, руководителю лаборатории биотехнологии, к.б.н. С.В. Альховскому и научному сотруднику лаборатории экологии риккетсий, к.м.н. Л.В. Ахмадишиной за проведение молекулярно-биологических исследований.

Список литературы/References

1. Медянский О.Ю., Иванов Л.И., Nishikawa M., Saito R., Сидельников И.Н., Здановская Н.И., Мокрецова Е.В., Тарасевич И.В., Suzuki H. Микроорганизм «Montezuma» из порядка Rickettsiales: потенциальный возбудитель клещевого трансмиссивного заболевания на Дальнем Востоке России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2004. № 1. С. 7–13. [Mediannikov O., Ivanov L.I., Nishikawa M., Saito R., Sidel'nikov I.N., Zdanovskaia N.I., Mokretsova E.V., Tarasevich I.V., Suzuki H. Microorganism "Montezuma" of the order Rickettsiales: the potential causative agent of tick-borne disease in the Far East of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2004, no. 1, pp. 7–13. (In Russ.)]
2. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae. Л.: Наука, 1977. 396 с. [Filippova N.A. Iksodovye kleshhi podsemejstva Ixodinae [Ixodidae, Ticks of Subfamily of Ixodinae]. *Leningrad: Nauka*, 1977. 396 p.]
3. Bazzocchi C., Mariconti M., Sasser D., Rinaldi L., Martin E., Cringoli G., Urbanelli S., Genchi C., Bandi C., Epis S. Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont Midichloria (Rickettsiales: Midichloriaceae) in different mammalian species. *Parasites & Vectors*, 2013, no. 6, pp. 350–356. doi: 10.1186/1756-3305-6-350
4. Beninati T., Lo N., Sacchi L., Genchi C., Noda H., Bandi C. A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick Ixodes ricinus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, no. 70, pp. 2596–2602. doi: 10.1128/AEM.70.5.2596-2602.2004
5. Beninati T., Riegler M., Vilcins I.M., Sacchi L., McFadyen R., Krockenberger M., Bandi C., O'Neill S.L., Lo N. Absence of the symbiont Candidatus Midichloria mitochondrii in the mitochondria of the tick Ixodes holocyclus. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, no. 299, pp. 241–247. doi: 10.1186/s13071-015-0958-3
6. Boscaro V., Petroni G., Ristori A., Verni F., Vannini C. "Candidatus Defluviella procrastinata" and "Candidatus Cyrtobacter zanobii", two novel ciliate endosymbionts belonging to the "Midichloria clade". *Microb. Ecol.*, 2013, no. 65, pp. 302–310. doi: 10.1007/s00248-012-0170-3
7. Dumler J., Walker D. Order II. Rickettsiales Gieszczykiewicz 1939, 25^{AL} emend. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Ed. Garrity G., Brenner D., Krieg N., Staley J. *New York, Springer-Verlag*, 2005, pp. 96–160.
8. Epis S., Mandrioli M., Genchi M., Montagna M., Sacchi L., Pistone D., Sasser D. Localization of the bacterial symbiont Candidatus Midichloria mitochondrii within the hard tick Ixodes ricinus by whole-mount FISH staining. *Ticks Tick-Borne Dis.*, 2013, no. 4, pp. 39–45. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.005
9. Epis S., Sasser D., Beninati T., Lo N., Beati L., Piesman J., Rinaldi L., McCoy K.D., Torina A., Sacchi L., Clementi E., Genchi M., Magnino S., Bandi C. Midichloria mitochondrii is widespread in hard ticks (Ixodidae) and resides in the mitochondria of phylogenetically diverse species. *Parasitology*, 2008, no. 135, pp. 485–494. doi: 10.1017/S0031182007004052
10. Fraune S., Bosch T.C. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, no. 104, pp. 13146–13151. doi: 10.1073/pnas.0703375104
11. Gofton A.W., Oskam C.L., Lo N., Beninati T., Wei H., McCarl V., Murray D.C., Papparini A., Greay T.L., Holmes A.J., Bunce M., Ryan U., Irwin P. Inhibition of the endosymbiont "Candidatus Midichloria mitochondrii" during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in Ixodes ticks from Australia. *Parasit Vectors*, 2015, no. 25, pp. 345–352. doi: 10.1186/s13071-015-0958-3
12. Granquist E.G., Kristiansson M., Lindgren P.E., Matussek A., Nødtvedt A., Okstad W., Stuen S. Evaluation of microbial communities and symbionts in Ixodes ricinus and ungulate hosts (Cervus elaphus and Ovis aries) from shared habitats on the west coast of Norway. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2014, no. 5 (6), pp. 780–784. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.005
13. Harrus S., Perlman-Avrahami A., Mumcuoglu K.Y., Morick D., Eyal O., Baneth G. Molecular detection of Ehrlichia canis, Anaplasma bovis, Anaplasma platys, Candidatus Midichloria mitochondrii and Babesia canis vogeli in ticks from Israel. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, no. 17 (3), pp. 459–463. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03316.x
14. Hess S., Suthaus A., Melkonian M. "Candidatus Finniella" (Rickettsiales, Alphaproteobacteria), Novel Endosymbionts of Viridiraptorid Amoeboflagellates (Cercozoa, Rhizaria). *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, vol. 82, no. 2, pp. 659–670. doi: 10.1128/AEM.02680-15
15. Jiang J., Maina A.N., Knobel D.L., Cleaveland S., Laudisoit A., Wamburu K., Ogola E., Parola P., Breiman R.F., Njenga M.K., Richards A.L. Molecular detection of Rickettsia felis and Candidatus Rickettsia asemboensis in fleas from human habitats, Asembo, Kenya. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2013, no. 13 (8), pp. 550–558. doi:10.1089/vbz.2012.1123
16. Lewis D. The detection of rickettsia-like microorganisms within the ovaries of female Ixodes ricinus ticks. *Z. Parasitenkd.*, 1979, no. 59 (3), pp. 295–298.
17. Lloyd S.J., LaPatra S.E., Snekvik K.R., St-Hilaire S., Cain K.D., Call D.R. Strawberry disease lesions in rainbow trout from southern Idaho are associated with DNA from a Rickettsia-like organism. *Dis. Aquat. Organ.*, 2008, no. 82, pp. 111–118. doi: 10.3354/dao01969
18. Lommano E., Bertaiola L., Dupasquier C., Gern L. Infections and coinfections of questing Ixodes ricinus ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, no. 78 (13), pp. 4606–4612. doi: 10.1128/AEM.07961-11
19. Mariconti M., Epis S., Gaibani P., Dalla Valle C., Sasser D., Tomao P., Fabbi M., Castelli F., Marone P., Sambri V., Bazzocchi C., Bandi C. Humans parasitized by the hard tick Ixodes ricinus are seropositive to Midichloria mitochondrii: is Midichloria a novel pathogen, or just a marker of tick bite? *Pathog. Glob. Health*, 2012, vol. 106, no. 7, pp. 391–396. doi: 10.1179/204773212Y.0000000050
20. Mariconti M., Epis S., Sacchi L., Biggiogera M., Sasser D., Genchi M., Alberti E., Montagna M., Bandi C., Bazzocchi C. A study on the presence of flagella in the order Rickettsiales: the case of "Candidatus Midichloria mitochondrii". *Microbiology*, 2012, vol. 158, iss. 7, pp. 1677–1683. doi: 10.1099/mic.0.057174-0

21. Matsuura Y., Kikuchi Y., Meng X.Y., Koga R., Fukatsu T. Novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts associated with stinkbugs and other arthropods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, no. 78, pp. 4149–4156. doi: 10.1128/AEM.00673-12
22. Mediannikov O., Aubadie-Ladrix M., Raoult D. Candidatus “Rickettsia senegalensis” in cat fleas in Senegal. *New Microbes New Infect.*, 2015, no. 3, pp. 24–28. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.005
23. Montagna M., Sasser D., Epis S., Bazzocchi C., Vannini C., Lo N., Sacchi L., Fukatsu T., Petroni G., Bandi C. “Candidatus Midichloriaceae” fam. nov. (Rickettsiales), an ecologically widespread clade of intracellular Alphaproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, no. 79, pp. 3241–3248. doi: 10.1128/AEM.03971-12
24. Murray R.G., Stackebrandt E. Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, no. 45 (1), pp. 186–187.
25. Ninio C., Plantard O., Serra V., Pollera C., Ferrari N., Cafiso A., Sasser D., Bazzocchi C. Antibiotic treatment of the hard tick *Ixodes ricinus*: influence on *Midichloria mitochondrii* load following blood meal. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2015, no. 6 (5), pp. 653–657. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.05.011
26. Palomar A.M., Portillo A., Santibáñez P., Mazuelas D., Roncero L., García-Álvarez L., Santibáñez S., Gutiérrez Ó., Oteo J.A. Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Med. Vet. Entomol.*, 2015, no. 29(3), pp. 349–353. doi: 10.1111/mve.12124
27. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, no. 26 (4), pp. 657–702. doi: 10.1128/CMR.00032-13
28. Paulsen K.M., Pedersen B.N., Soleng A., Okbaldet Y.B., Pettersson J.H., Dudman S.G., Ottesen P., Vik I.S., Vainio K., Andreassen Å. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks from three islands in north-western Norway. *APMIS*, 2015, no. 123 (9), pp. 759–764. doi: 10.1111/apm.12412
29. Ponnusamy L., Gonzalez A., Van Treuren W., Weiss S., Parobek C.M., Juliano J.J., Knight R., Roe R.M., Apperson C.S., Meshnick S.R. Diversity of Rickettsiales in the microbiome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, no. 80 (1), pp. 354–359. doi: 10.1128/AEM.02987-13
30. Rendulic S., Jagtap P., Rosinus A., Eppinger M., Baar C., Lanz C., Keller H., Lambert C., Evans K.J., Goesmann A., Meyer F., Sockett R.E., Schuster S.C. A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 2004, vol. 303, iss. 5658, pp. 689–692. doi: 10.1126/science.1093027
31. Reye A.L., Stegny V., Mishaeva N.P., Velhin S., Hübschen J.M., Ignatyev G., Muller C.P. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS One*, 2013, no. 8 (1): e54476. doi: 10.1371/journal.pone.0054476.
32. Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubálek Z., Földvári G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Spitalská E., Kazimírová M. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front. Public Health.*, 2014, vol. 2:251. doi: 10.3389/fpubh.2014.00251
33. Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, no. 47 (2), pp. 252–261. doi: 10.1099/00207713-47-2-252
34. Sacchi L., Bigliardi E., Corona S., Beninati T., Lo N., Franceschi A. A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue Cell*, 2004, no. 36, pp. 43–53. doi: 10.1016/j.tice.2003.08.004
35. Sanogo Y.O., Parola P., Shpynov S., Camicas J.L., Brouqui P., Caruso G., Raoult D. Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in Northeastern Italy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, no. 990, pp. 182–190. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07360.x
36. Sasser D., Beninati T., Bandi C., Bouman E.A., Sacchi L., Fabbi M., Lo N. “Candidatus *Midichloria mitochondrii*”, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, no. 56, pp. 2535–2540. doi: 10.1099/ijs.0.64386-0
37. Sasser D., Lo N., Bouman E.A., Epis S., Mortarino M., Bandi C. “Candidatus *Midichloria*” endosymbionts bloom after the blood meal of the host, the hard tick *Ixodes ricinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, no. 74, pp. 6138–6140. doi: 10.1128/AEM.00248-08
38. Sasser D., Lo N., Epis S., D’Auria G., Montagna M., Comandatore F., Horner D., Pereto J., Luciano A.M., Franciosi F., Ferri E., Crotti E., Bazzocchi C., Daffonchio D., Sacchi L., Moya A., Latorre A., Bandi C. Phylogenomic evidence for the presence of a flagellum and *cbb(3)* oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, no. 28, pp. 3285–3296. doi: 10.1093/molbev/msr159
39. Schrällhammer M., Ferrantini F., Vannini C., Galati S., Schweikert M., Görtz H.D., Verni F., Petroni G. “Candidatus *Megaira polyxenophila*” gen. nov., sp. nov.: considerations on evolutionary history, host range and shift of early divergent rickettsiae. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 8:e72581. doi: 10.1371/journal.pone.0072
40. Shpynov S. *Ixodes persulcatus*, a major vector of Alphaproteobacteria in Russia. *Ticks Tick-borne Dis.*, 2012, no. 3, pp. 304–306. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.029
41. Skarphedinsson S., Jensen P.M., Kristiansen K. Survey of tickborne infections in Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, no. 11, pp. 1055–1061. doi: 10.3201/eid1107.041265
42. Szokoli F., Sabaneyeva E., Castelli M., Krenek S., Schrällhammer M., Soares C.A., Da Silva-Neto I.D., Berendonk T.U., Petroni G. “Candidatus *Fokinia solitaria*”, a novel “stand-alone” symbiotic lineage of Midichloriaceae (Rickettsiales). *PLoS One*, 2016, no. 11:e0145743. doi: 10.1371/journal.pone.0145743

43. Toft C., Fares M.A. The evolution of the flagellar assembly pathway in endosymbiotic bacterial genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 2008, no. 25, pp. 2069–2076. doi: 10.1093/molbev/msn153
44. Vannini C., Ferrantini F., Schleifer K.H., Ludwig W., Verni F., Petroni G. “Candidatus anadelfobacter veles” and “Candidatus Cyrtobacter comes” two new rickettsiales species hosted by the protist ciliate *Euplotes harpa* (Ciliophora, Spirotrichea). *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, no. 76, pp. 4047–4054. doi: 10.1128/AEM.03105-09
45. Williams-Newkirk A.J., Rowe L.A., Mixson-Hayden T.R., Gregory A.D. Presence, genetic variability, and potential significance of “Candidatus Midichloria mitochondrii” in the lone star tick *Amblyomma americanum*. *Exp. Appl. Acarol.*, 2012, no. 58, pp. 291–300. doi: 10.1007/s10493-012-9582-5
46. Zhu Z., Aeschlimann A., Gern L. Rickettsia-like microorganisms in the ovarian primordia of molting *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1992, no. 67, pp. 99–110.

Автор:

Шпынов С.Н., д.м.н., руководитель лаборатории экологии риккетсий ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия.

Author:

Shpynov S.N., PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Ecology of Rickettsiae, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.06.2016
Отправлена на доработку 08.07.2016
Принята к печати 21.07.2016

Received 21.06.2016
Revision received 08.07.2016
Accepted 21.07.2016

ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА НА ПРОГРЕССИЮ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Н.Н. Полищук, А.М. Камышный

Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Резюме. В свете современных представлений, микробиом кишечника оказывает существенное влияние на функционирование организма в целом, в том числе иммунной системы, желудочно-кишечного тракта и печени. В данном обзоре отображены современные представления о влиянии кишечного микробиома на прогрессирование хронических вирусных гепатитов, обусловленных HCV- и HBV-инфекцией, а также особенности изменений микробиоценоза кишечника в зависимости от длительности хронического процесса в печени. Обозначено, что прогрессирование хронического гепатита до стадии цирроза печени сопровождается снижением количества *Bifidobacterium* и штаммов, продуцирующих молочную кислоту: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* и избыточным ростом условно-патогенных видов *Enterococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Candida* spp., *Clostridia* spp. Последние обуславливают поступление в кровотока микробных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, в том числе различного рода токсинов, которые играют роль в прогрессировании иммуновоспалительных процессов в печени. При этом у пациентов с HBV и HCV-инфекцией в крови и печени значительно повышается количество CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ Treg клеток, оказывающих иммуносупрессивный эффект, а функция специфических CD8 лимфоцитов значительно снижена и недостаточна для нивелирования вируса. Микробный дисбаланс оказывает негативное действие на биосинтез желчных кислот и функционирование стеролибиома нашего организма вследствие изменения равновесия между *Bacteroides/Firmicutes*, разрастания патогенных и условно патогенных *Enterobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Alcaligenaceae* и *Porphyromonadaceae*, *Clostridium* кластера XIVa, а также *Helicobacter* spp. и *Clostridium difficile*. Образование этими штаммами токсинов и различного рода канцерогенных метаболитов приводит к развитию воспалительных процессов в кишечнике, и, как следствие, к прогрессированию воспалительного процесса в печени. В свою очередь, снижение количества бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты способствует колонизации кишечника патогенными представителями *Gracilicutes* (*Salmonella*, *Shigella*, энтерогеморрагические *E. coli*) и *Firmicutes* (*Clostridia*), токсины которых оказывают прямое токсическое действие на печень. Рассматривается малоизученный вопрос возможного кофакторного влияния кишечных вирусов (ротавирусов, аденовирусов, полиовируса 1 типа, вирусов Коксаки, ECHO) и бактерий (*Shigella*, *Salmonella*, диареогенные *E. coli*, *C. jejuni*) на прогрессирование хронических гепатитов. В связи с вышеизложенным, необходимо проведение дальнейшего детального изучения влияния микробиома кишечника на прогрессию хронических гепатитов HBV/HCV этиологии с целью разработки комплексного подхода к терапии и снижению рисков развития неблагоприятных исходов у больных.

Ключевые слова: хронический гепатит, цирроз печени, иммунитет, микробиом кишечника, короткоцепочечные жирные кислоты, желчные кислоты, метаболизм.

Адрес для переписки:

Полищук Наталья Николаевна
169035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26,
Запорожский государственный медицинский университет.
Тел.: +380 994 63-60-78.
E-mail: natalya-polishchuck@ya.ru

Contacts:

Nataliia N. Polishchuk
69035, Ukraine, Zaporozhye, Mayakovsky pr., 26,
Zaporozhye State Medical University.
Phone: +380 994 63-60-78.
E-mail: natalya-polishchuck@ya.ru

Библиографическое описание:

Полищук Н.Н., Камышный А.М. Влияние кишечного микробиома на прогрессию вирусных гепатитов // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 325–334. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-325-334

Citation:

Polishchuk N.N., Kamyshny A.M. Effect by intestinal microbiom on the progression of viral hepatitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 325–334. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-325-334

EFFECT BY INTESTINAL MICROBIOM ON THE PROGRESSION OF VIRAL HEPATITIS

Polishchuk N.N., Kamyshny A.M.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Abstract. According to the modern concepts an intestinal microbiome has a significant effect on the functioning of the whole body including the immune system, digestive tract and liver in particular. This review displays current understanding of the intestinal microbiome impacting on the progression of chronic viral hepatitis caused by HCV- and HBV-infection, as well as changes in bowel microbiocenosis features depending on the duration of chronic process in the liver. It is indicated that chronic hepatitis to cirrhosis progression is accompanied by Bifidobacterium and strains of lactic acid (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*) number decreasing and overgrowth of opportunistic species such as *Enterococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Candida* spp., *Clostridia* spp. This phenomena caused by PAMPs entry into the bloodstream including various types of toxins playing a role in liver immune inflammation processes progression. Thus patients with HBV and HCV infection are increased the number of CD4⁺, CD25⁺ in the blood and liver significantly, FOXP3⁺ Treg cell providing an immunosuppressive effect, and the function of specific CD8 lymphocytes is reduced and insufficient leveling virus significantly. Microbial imbalance has a negative effect on the biosynthesis of bile acids and sterolbiom functioning of our body as a result of changes in the balance between Bacteroides/Firmicutes, overgrowth of pathogenic and opportunistic *Enterobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Alcaligenaceae* and *Porphyromonadaceae*, *Clostridium* cluster XIVa, *Helicobacter* spp. and *Clostridium difficile*. These toxins formation and various carcinogenic metabolites from these strains leads to the inflammation development in the intestines and as a consequence to the progression of the inflammatory process in the liver. In turn, the reduction in the bacteria number producing short-chain fatty acid contributes to intestinal colonization by pathogenic representatives *Gracilicutes* (*Salmonella*, *Shigella*, enterohaemorrhagic *E. coli*) and *Firmicutes* (*Clostridia*), the toxins having a direct toxic effect on the liver. It is examined a little-studied question about a possible cofactor effect of enteric viruses (rotavirus, adenovirus, poliovirus type 1, Coxsackie virus, ECHO) and bacteria (*Shigella*, *Salmonella*, diarrheagenic *E. coli*, *C. jejuni*) on the progression of chronic hepatitis. In view of the above, it is necessary to study in further detailed the influence of the intestinal microbiome on the progression of chronic hepatitis HBV/HCV etiology in order to develop a comprehensive approach to treatment and reduce the risk of adverse outcomes in patients.

Key words: chronic hepatitis, liver cirrhosis, immune system, intestinal microbiome, short chain fatty acids, bile acids, metabolism.

Хронические вирусные гепатиты (ХВГ) являются одной из важнейших медико-социальных и экономических проблем здравоохранения во всем мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и результатов статистических исследований, серологические маркеры имеющейся или перенесенной HBV-инфекции определяются примерно у 1/3 всего населения планеты, при этом 350–400 млн человек являются хроническими носителями поверхностного HBsAg. В мире инфицировано HCV порядка 150 млн человек, из которых 85% — хронические носители вируса гепатита С. Ежегодно от терминальных поражений печени или гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), обусловленных HBV, погибает 1 млн человек и более 350 тыс. человек умирают от осложнений, обусловленных HCV [26, 29]. В Украине заболеваемость вирусными гепатитами ежегодно неуклонно растет. По данным ВОЗ и Центра мониторинга и контроля за заболеваемостью МОЗ Украины, более 3% людей в Украине инфицированы гепатитом С и порядка 7% являются хроническими носителями вируса гепатита В [2, 3].

В свете современных представлений, микробиом кишечника оказывает существенное влияние на функционирование организма в целом,

пищеварительной системы и печени, в частности (табл.). Кроме участия в процессах метаболизма, микробиота имеет решающее значение в формировании иммунной системы и играет ключевую роль в развитии адаптивного иммунного ответа в слизистой оболочке кишечника [14]. Так, представители *Firmicutes* — лактобактерии и бифидобактерии — влияют на индукцию IgA, дифференцировку разных типов иммунных клеток (Th1, Th17, Foxp3⁺ регуляторные Т клетки и др.), а также участвуют в реализации защиты организма от гепатотропных вирусов [19, 36, 37, 48, 62]. В частности, штаммы *Lactobacillus casei* Shirota обладают свойством смещать баланс (Th) от Th2 в сторону Th1, играющих роль в реакциях клеточного иммунитета и обеспечивающих противовирусный иммунитет. В свою очередь, *Lactobacillus rhamnosus* индуцируют субпопуляцию Th3, синтезирующих противовоспалительный IL-10, переключающий дифференцировку клеток с Th2 на Th1 [18, 47]. *Bifidobacterium adolescentis* с помощью интерферон-индуцируемых противовирусных эффекторов, способен ингибировать HBV путем угнетения экспрессии ДНК, HBsAg HBV, тем самым снижая уровень внеклеточного HBsAg и оказывая противовирусный эффект [40]. Колонизация кишечника грамотрицатель-

ными *Bacteroides fragilis* увеличивает количество Т-супрессоров и индуцирует продукцию противовоспалительных цитокинов Foxp3⁺ Т-клетками в кишечнике [37, 44]. В свою очередь, печень, обладая уникальной анатомической архитектоникой, синтезирует огромное разнообразие белковых молекул (белки острой фазы — APPs), обладающих бактерицидными свойствами и принимающих участие в реакциях врожденного иммунитета. Так, продуцируемые печенью компоненты комплемента участвуют в активации системы комплемента как по классическому пути (C1R/c, C2, C4, C4bp), так и по альтернативному (C3, фактор В) и лектиновому пути (манноза-связывающий лектин — MBL, маннан-связывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы — MASP1-3, MAp19). С-реактивный белок (CRP), являясь сильным опсоном для многих бактерий, грибов и паразитов запускает классический путь комплемента, а также увеличивает экспрессию провоспалительных (IL-1, IL-6, IL-18, TNF α) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1R). Сывороточный амилоидный протеин (SAA), обладая свойствами опсоина для грамотрицательных бактерий, облегчает фагоцитоз таких микроорганизмов, как например *E. coli* и *P. aeruginosa*. Кроме того, гепатоциты

играют важную роль в метаболизме некоторых железосвязывающих белков (трансферрина, липокалина-2, гемопексина, гепсидина), оказывая, таким образом, ключевое бактерицидное влияние.

По данным литературы, практически у всех пациентов с хроническими вирусными гепатитами при обследовании обнаруживаются дисбиотические изменения в кишечнике [10, 24]. Нарушения микробного равновесия взаимосвязаны со степенью активности воспаления, морфологическими изменениями в печени, а также коррелируют с характером течения и стадией заболевания [4, 5, 44, 45, 55, 56]. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой и толстой кишке диагностируется у 94,6% больных хроническим гепатитом С (ХГС) и у 87,5% пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ) [9]. При этом, по данным Закирова (2002 г.), дисбиоз кишечника при ХГС в отличие от ХГВ характеризуется высокой частотой дефицита лактозопозитивных эшерихий (53,5 против 38%), бифидобактерий (36 против 23,8%) и молочнокислых стрептококков (21,6 против 11%), а также частой ассоциацией с дрожжеподобными грибами (33,5 против 14%). При ХГВ наиболее часто выявляются ассоциации с протеом (38 против 9%), клостридиями (33 против 12%) и другими

ТАБЛИЦА. ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА И ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКИХ ГЕПАТИТОВ В И С

| Виды бактерий, количество которых снижается | Основные функции, выполняемые в кишечнике | Виды бактерий, количество которых увеличивается | Основные функции, выполняемые в кишечнике |
|---|--|--|--|
| <i>Bifidobacterium</i> | Участие в реакциях гуморального и клеточного иммунитета [38], защита от гепатотропных вирусов [59], противовоспалительный эффект [37], биосинтез желчных кислот [33, 34], антихолестеринемический эффект [7], продукция КЦЖК [1, 15, 41] | <i>Enterobacteriaceae</i> , в т.ч. <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , EHEC, ETEC | Образование патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (бактериальные токсины, компоненты клеточной стенки, ДНК), оказывающих повреждающее действие на гепатоциты и вызывающих развитие каскада воспалительных иммунопатологических, в т.ч. аутоиммунных, процессов в печени [11, 30, 38, 47]. Образование канцерогенных метаболитов, запускающих каскад фибро- и онкогенеза [39]. Продукция метаболитов, оказывающих токсическое влияние на нервную систему и организм в целом [49] |
| <i>Lactobacillus</i> | Участие в реакциях гуморального и клеточного иммунитета [38], защита от гепатотропных вирусов [59], дегидроксилирование желчных кислот [33] | <i>Veillonellaceae</i> | |
| <i>Bacteroides</i> | Дегидроксилирование желчных кислот [33, 56], продукция КЦЖК (бутирата), противовоспалительный эффект [45, 49] | <i>Porphyromonadaceae</i> | |
| <i>Clostridium cluster XIVa</i> | Дегидроксилирование желчных кислот [33], продукция КЦЖК [45] | <i>Alcaligenaceae</i> | |
| <i>Lachnospiraceae</i> (<i>Coprococcus</i> , <i>Pseudobutyrvibrio</i> , <i>Roseburia</i>) | Продукция бутирата, противовоспалительный эффект [37, 45] | <i>Enterococcaceae</i> | |
| <i>Ruminococcaceae</i> (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) | | <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Helicobacter</i> spp., <i>Fusobacteria</i> | |

условно патогенными бактериями (38% против 22%) [6]. Установлено, что прогрессирование хронического гепатита В до стадии цирроза печени (ЦП) сопровождается снижением количества *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium longum*) и штаммов, продуцирующих молочную кислоту: *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentus*), *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* [43, 59, 61, 63].

Несмотря на то, что печень не находится в непосредственном контакте с живыми микроорганизмами, населяющими желудочно-кишечный тракт, безоговорочным является тот факт, что любые нарушения микробиоценоза кишечника оказывают неизбежно отрицательное влияние на патофизиологическое и морфофункциональное состояние печени вследствие воздействия микробных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМРs) — эндотоксинов (липополисахаридов), бактериальных метаболитов, а также бактериальной ДНК и компонентов клеточной стенки [48]. Постоянное поступление РАМРs в кровоток вследствие избыточного роста условно-патогенных видов *Enterococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Candida* spp., *Clostridia* spp. приводит к выделению провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 клетками Купфера и повышенному образованию секреторных иммуноглобулинов [11, 12, 25, 38]. Связываясь с Toll-подобными-4 рецепторами на поверхности Купферовских и звездчатых клеток, РАМРs влияют на иммунные процессы в печени и играют важную роль в развитии воспаления и фиброза печени при хроническом ее поражении [32, 44, 64]. К сожалению, существующие у пациентов с вирусными гепатитами дисбиотические изменения и, связанные с ними, иммунные нарушения значительно усугубляют течение иммунных процессов в печени, способствуя хронизации как HCV-, так и HBV-инфекции. При этом, у пациентов с HBV-инфекцией, в крови и печени значительно повышается количество Th17, вырабатывающих IL-17 и IL-22 и, таким образом, обладающих потенциалом усугублять поражение печени. Прогрессирование инфекционного процесса сопровождается увеличением в периферической крови и печени HBV-специфических CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ Treg клеток, оказывающих иммуносупрессивный эффект и подавляющих продукцию HBV-опосредованного интерферона γ (IFN γ), а также пролиферацию аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови. Необходимо отметить, что фундаментальную роль в элиминации вируса, а следовательно и в прогнозе HBV-инфекции играют HBV-специфические CD8 Т-клетки. Их активация, а также активация

HBV-неспецифических врожденных иммунных клеток (макрофагов), приводит к увеличению продукции IFN γ и фактора некроза опухоли (TNF α), который, в свою очередь, нецитолитически ингибирует репликацию HBV в инфицированных гепатоцитах и приводит к элиминации вируса. Возможно, механизм данного ингибирования связан с подавлением сборки прегеномных РНК-содержащих капсидов или ускорением их деградации, приводящей к предотвращению репликации HBV и протеасомозависимой деградации вируса. После завершения острой фазы HBV-инфекции, некоторые из HBV-специфических CD8 Т-клеток дифференцируются в Т-клетки памяти с увеличением экспрессии CD127, предотвращающих HBV-реинфекцию [20]. Но при хронической инфекции HBV-специфические CD8 Т-лимфоциты функционально крайне истощены [22]. Кроме того, дисфункции Т-лимфоцитов способствуют супрессорные клетки миелоидного происхождения CD11b⁺ Gr-1⁺ (MDSCs), присутствующие в печени у пациентов с хроническим гепатитом. Известно, что клетки Gr-1^{dim} экспрессируют маркер миелоидных клеток CD11b и, как правило, представляют собой незрелые клетки (предшественники гранулоцитов, моноцитов, дендритных клеток), которые, образуясь в больших количествах под воздействием воспалительных факторов, подавляют Т-клеточный ответ и за счет этого вносят вклад в патогенез основного заболевания [31].

При острой HCV-инфекции в крови определяется большое количество HCV-специфических CD4 Т-клеток, обладающих более высокой иммунной активностью и синтезирующих IL-2, который имеет жизненно важное значение для CD4 и активации Т-клеток CD8. Утрата способности лимфоцитами CD4 секретировать IL-2 в связи с прогрессированием СНС приводит к нарушению пролиферации и продукции IFN γ клетками CD8. И хотя HCV-специфические CD8 лимфоциты продолжают обладать способностью размножаться, проявляют цитотоксичность и секретируют IFN γ , их функциональная активность становится значительно сниженной и недостаточной для того, чтобы нивелировать вирус [57]. Изучая иммунные процессы в печени, Kared et al. в своих исследованиях показали, что у пациентов с острой HCV-инфекцией в крови содержится более высокое количество Т-клеток, секретирующих IL-21, по сравнению с пациентами с хронической формой гепатита С. Такая повышенная продукция IL-21 способствует возрастанию количества HCV-специфических CD8 Т-клеток и предотвращает их гал-9-индуцированный апоптоз *in vitro*. Кроме того, при острой форме гепатита HCV-специфические CD4 Т-лимфоциты

способствуют созреванию CD8 Т-клеток памяти, предотвращающих повторное инфицирование HCV. В противоположность этому, при хронической форме гепатита С и развивающейся гепатокарциноме снижается количество CD4 лимфоцитов, секретирующих IL-21 и увеличивается количество CD4⁺CD25⁺, Foxp3⁺ Treg клеток, которые в опытах *in vitro* могут непосредственно подавлять HCV-специфические CD8 Т-клетки [21, 33]. Таким образом, изменения количественного и качественного состава микробиома кишечника при HCV- и HBV-инфекциях являются одним из звеньев сложного патологического процесса, взаимосвязанного не только с изменениями иммунитета печени, но и нарушениями функционирования иммунной системы всего организма.

Известно, что ферменты, вырабатываемые облигатной микрофлорой принимают участие в биосинтезе желчных кислот, оказывая антихолестеринемический эффект. Под воздействием бифидобактерий и лактобацилл образуются вторичные желчные кислоты (дезоксихолевая и литохолевая), а также происходит трансформация холестерина в копростанол, который не подвергается абсорбции в кишечнике и выводится из организма с фекалиями [7, 41, 45, 53]. Желчные кислоты, функциональная активность которых реализуется через ядерные рецепторы (nuclear-farnesoid-X receptor, FXR), G-белок рецепторов плазматической мембраны макрофагов (GPCR, TGR5), являющиеся гормоноподобными регуляторами собственного синтеза, энергетического баланса, транспорта, углеводного и липидного обмена. Таким образом, применяемый в настоящее время термин «стеролбиом» наиболее точно характеризует всю совокупность кишечной микробиоты, представляющей из себя мощный эндокринный орган, который способен продуцировать различные классы ферментов (гидроксистероиддегидрогеназы — HSDH и др.), участвующих в синтезе и метаболизме желчных кислот [41, 52, 53].

Известно, что образующаяся в ходе метаболизма дезоксихолевая кислота является самым мощным антибактериальным агентом, участвующим в регуляции состава кишечной микрофлоры. Следовательно, количественный состав пула желчных кислот — основной регулятор структуры микробиома, который является важным регулятором размера пула желчных кислот. Снижение пула желчных кислот приводит к увеличению количества микроорганизмов, обладающих провоспалительными эффектами и продуцирующими токсические метаболиты, которые, в свою очередь, способствуют уменьшению синтеза желчных кислот в результате воспаления [52, 60]. В результате постоянного воспаления и прогрессирования

цирроза печени подавляется синтез желчных кислот в печени, что формирует механизм обратной положительной связи.

Уменьшение количества поступающих в кишечник желчных кислот способствует изменению равновесия между *Bacteroides* и *Firmicutes*, разрастанию патогенных и условнопатогенных микроорганизмов, включая *Enterobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Alcaligenaceae* и *Porphyromonadaceae*, а также снижению количества в толстой кишке представителей рода *Clostridium* кластера XIVa [34, 35, 52]. Последние включают в себя дегидроксилирующие микроорганизмы, например, *Clostridium sciendens*, участвующие в образовании вторичных желчных кислот — дезоксихолевой и литохолевой, и использующие желчные кислоты в качестве акцепторов электронов для увеличения синтеза АТФ и роста. Нарушение образования вторичных желчных кислот вследствие микробного дисбаланса приводит к стимуляции первичными желчными кислотами роста *Clostridium difficile* [53]. В свою очередь, воспаление в тонкой кишке, обусловленное *Clostridium difficile* приводит к микробной транслокации, одним из механизмов которой является ослабление антимикробной защиты клетками Панета в криптах тонкой кишки, и прогрессированию воспалительного заболевания печени вследствие массивного поступления PAMPs [52, 56].

Ферментация углеводов микроорганизмами (*Lactobacillales*, *Bifidobacteriales*, *Actinomycetales* и др.), населяющими толстую кишку, приводит к образованию короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), регулирующих клеточную пролиферацию и дифференцировку, липидный и углеводный обмен, оказывающих противомикробное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [15, 42, 45]. Так, например, основными продуцентами бутирата, способствующего уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов (IL-8, TNF α), являются анаэробные бактерии видов *Eubacterium rectale*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium hallii*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Coprococcus*, а также фузобактерии и непатогенные виды клостридий кластера XIVa [15, 38, 46, 60]. При этом 45% бутиратпродуцирующих штаммов являются некультивируемыми. Бактерии видов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* являются основными продуцентами ацетата, *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Arachnia*, *Anaerovibrio* (polar flagella) — пропионата [1, 16]. Обладая антимикробной активностью, КЦЖК служат важным фактором в поддержании баланса микробной экосистемы, препятствуя колонизации кишечника патогенными представителями *Gracilicutes* (*Salmonella*, *Shigella*, энтерогеморагические *E. coli*) и *Firmicutes* (*Clostridia*) [49].

Нарушение баланса КЦЖК вследствие избыточного бактериального роста при хронических гепатитах приводит к повышенному образованию кишечной микрофлорой таких канцерогенных метаболитов, как ацетальдегид (продуцируется *Bacteroides vulgatus*, *Eubacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *Streptococcus hansenii*, *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*), сероводород и супероксидные радикалы (продуцируются *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium*, *Deltaproteobacteria*), аммиак. Последний производится уреазы-продуцирующими штаммами (*Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* и др.), обильно разрастающимися при повышении pH среды в кишечнике, и является прямым продуктом цикла метаболизма мочевины. Вследствие длительного воспалительного процесса в печени и нарушения барьерной функции печени, аммиак, поступая в кровь, оказывает токсическое влияние на нервную систему, а также усугубляет воспалительный процесс в печени [51].

Согласно последним данным, немаловажную роль в повышении риска злокачественной трансформации хронических вирусных гепатитов в ЦП и ГЦК играют представители рода *Helicobacter*, в частности *H. pylori* и внежелудочные — *H. hepaticus*, *H. billis*, *H. canis*, *H. cinaedi*, *H. rappini*, *H. pullorum* [8, 13, 27, 50].

Негативное влияние этих микроорганизмов подтверждается обнаружением их ДНК в биоптатах печени. Кофакторное взаимодействие как между представителями *Helicobacter*, так и между ними и представителями других родов микробиома кишечника, обуславливает прогрессирование хронических гепатитов [28, 30, 39]. Для *H. pylori* хронический воспалительный процесс в печени, по всей видимости, является предрасполагающим фактором для инфицирования слизистой желудка. При этом частота выявления этого микроорганизма в желудочном содержимом повышается с увеличением продолжительности течения ХВГ. Так, у больных с продолжительностью заболевания до 3 лет *H. pylori* обнаруживается в 68% случаев, а при продолжительности хронического процесса более 5 лет — в 92% [5, 6]. *H. pylori*, являясь мощным индуктором воспалительного процесса, усиливает каскад воспалительных реакций происходящих при вирусных гепатитах, приводя к более интенсивному поражению клеток печени [8, 39, 54]. Штаммы *H. pylori*, обладающие иммунодоминантным белком Саg А, кодируемым геном Саg А островка патогенности, способны активировать каскад реакций с участием митогенактивированного протеина (МАП-киназы). Таким образом, активация онкогенов при ХВГ может представлять собой решающий шаг в неоплазии, индуцированной *H. pylori* [8].

Внежелудочные виды *Helicobacter* также могут играть роль в трансформации ХГС в ЦП и ГЦК, участвуя в запуске аутоиммунных реакций и вырабатывая токсины, способные вызывать гепатоцеллюлярное повреждение. Антитела, образующиеся на поверхностные антигены *H. hepaticus* могут реагировать на собственные гепатоциты и клетки эпителия желчных канальцев. Выработка гранулирующего токсина *H. hepaticus* приводит к появлению цитоплазматических гранул в пораженных гепатоцитах. В свою очередь, синтез компонента cdtB — цитолетального расширяющего токсина — штаммами *H. hepaticus*, а также *H. billis*, *H. canis*, *H. cinaedi*, *H. pullorum*, и обладающего ДНКазной активностью, запускает каскад фибро- и онкогенеза, вследствие остановки клеточного цикла, аномального накопления актина в цитоскелете, прогрессирующего расширения клеток и их гибели [17, 39].

Следует упомянуть, что помимо бактерий в желудке и кишечнике обнаруживается около 200 различных видов РНК- и ДНК-содержащих вирусов, принадлежащих к 12 семействам. Большая часть из них не вызывает клинической симптоматики, однако значение их в норме и роль в патологических процессах, происходящих во всем организме, к кишечнику, и в печени, окончательно не выяснены. К сожалению, данных о влиянии смешанных вирусно-бактериальных инфекций на течение хронических гепатитов и их роль в развитии гепатоцеллюлярной карциномы и цирроза печени отсутствуют. Согласно результатам исследований Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (Австралия), присутствие у пациентов в кишечном содержимом возбудителей бактериальных кишечных инфекций сопровождается высокой частотой обнаружения аденовирусов и ротавирусов. Так, аденовирусы выявляются в 0,2% случаев в ассоциациях с энтеропатогенными эшерихиями (ЕПЕС), в 3,2% — с энтеротоксигенными эшерихиями (ЕТЕС), в 0,03% — с *Shigella*, в 0,26% — с *Salmonella*, в 0,5% — с *C. jejuni*; частота ассоциаций увеличивается при хронических вирусных гепатитах и гепатоцеллюлярной карциноме. Ротавирусы обнаруживаются в 3% случаев в ассоциациях с ЕПЕС и в 7,1% — с ЕТЕС. В опытах *in vitro* показано, что в присутствии некоторых энтеровирусов (полиовируса 1 типа, вируса Коксаки В3, вируса ЕСНО 6) может усиливаться инвазивность таких патогенных микроорганизмов, как шигеллы, ЕТЕС, ЕИЕС (энтероинвазивные эшерихии). Инвазивность *C. jejuni* значительно увеличивается в клетках Нер-2 в присутствии вирусов ЕСНО 7, Коксаки В3. Вероятно, вирусная репликация способствует появлению на клеточной мембране энтероцитов рецепторов, облегчающих адгезию

и инвазию бактерий [23]. Такие вирусно-бактериальные ассоциации при дисбиозах у больных с хроническими гепатитами могут иметь гораздо более серьезное влияние на течение заболевания и его клинический исход, чем монобактериальные инфекции.

Необходимо заметить, что обсуждаемые в литературе результаты исследований касаются только тех микроорганизмов, культивирование которых не вызывает затруднений в обычной лабораторной практике. Большинство данных получены либо с использованием водородных тестов, либо с помощью рутинных бактериологических методов исследований. Диапазон выделяемых при бактериологических исследованиях микроорганизмов достаточно узок и не может дать реального представления об участии всех представителей кишечного микробиома в прогрессировании хронических гепатитов и развитии ГЦК и ЦП.

Таким образом, качественный и количественный состав микрофлоры кишечника мо-

жет оказывать существенное влияние на течение хронических вирусных гепатитов, обусловленных HВV и HСV. Микробный дисбаланс, приводящий к интенсивному поступлению патоген-ассоциированных паттернов и микробных канцерогенов, оказывает отрицательное влияние на патофизиологические и иммунные процессы в печени. Нарушение образования желчных кислот и продукции короткоцепочечных жирных кислот усугубляет течение процесса и является одним из важных факторов, обуславливающих переход хронического гепатита в ЦП или ГЦК.

Полученные нами в ходе изучения литературы данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего и более детального изучения кофакторного влияния микробиома кишечника и HВV/HСV вирусов на гепатоциты с целью разработки комплексного подхода к терапии и снижению рисков развития неблагоприятных исходов у больных, страдающих хроническими формами гепатитов В и С.

Список литературы/References

1. Ардатская М.Д. Масляная кислота и инулин в клинической практике. Теоретические аспекты и возможности применения. М.: Форте принт, 2014. 64 с. [Ardatskaya M.D. Maslyanaya kislota i inulin v klinicheskoi praktike. Teoreticheskie aspekty i vozmozhnosti primeneniya [Butyric acid and inulin in clinical practice. Theoretical aspects and applications]. *Moscow: Forte print, 2014. 64 p.*]
2. Гураль А.Л., Мариевский В.Ф., Сергеева Т.А., Шагинян В.Р. Современное состояние проблемы эпидемиологии гепатита С в Украине // Мир вирусных гепатитов. 2009. № 2. С. 27–28. [Gural A.L., Marievsky D.F., Sergeeva T.A., Shaginyan V.R. The present condition of problem of the epidemiology of hepatitis C in Ukraine. *Mir virusnykh gepatitov = World of Viral Hepatitis, 2009, no. 2, pp. 27–28. (In Russ.)*]
3. Домашенко О.М., Біломеря Т.А., Дараган Г.М., Філіппова Т.І., Ткаченко І.М. Про захворюваність на парентеральні гепатити в Донецькій області в 2014 році // Актуальна нефрологія. 2014. № 3 (4). С. 31–34. [Domashenko O.M., Bilomerya T.A., Daragan H.M., Filippova T.I., Tkachenko I.M. About parenteral hepatitis incidence in the Donetsk region in 2014. *Aktual'na nefrologiya = Actual Nephrology, 2014, vol. 3, no. 4, pp. 31–34.*]
4. Ершова И.Б. Особенности кишечного микробиоценоза при вирусных гепатитах и возможности его коррекции. Актуальная инфектология. 2014. № 2 (3). С. 7–11. [Yershova I.B. Features of intestinal microbiocenosis in viral hepatitis and possible correction. *Aktual'naya infektologiya = Actual Infectology, 2014, no. 2 (3), pp. 7–11. (In Russ.)*]
5. Закиров И.Г. Дисбактериоз кишечника при хронических вирусных гепатитах. Казань: ЗАО «Новое знание», 2002. 102 с. [Zakirov I.G. Disbakterioz kishhechnika pri khronicheskikh virusnykh gepatitakh [Intestinal dysbiosis in chronic viral hepatitis]. *Kazan: JSC "New knowledge", 2002. 102 p. (In Russ.)*]
6. Закиров И.Г. Микроэкология толстого кишечника больных хроническим вирусным гепатитом // Казанский медицинский журнал. 2002. № 1. С. 38–40. [Zakirov I.G. Microecology colon of patients with chronic viral hepatitis. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal, 2002, no. 1, pp. 38–40. (In Russ.)*]
7. Ильченко А.А. Желчные кислоты в норме и при патологии // Здоров'я України. 2011. № 9. С. 22–24. [Ilchenko A.A. Bile acids in health and disease. *Zdorov'ya Ukraini = Health Protection of Ukraine, 2011, no. 9, pp. 22–24. (In Russ.)*]
8. Кляритская И.Л., Кривой В.В., Матрау С. Значение бактерий рода *Helicobacter pylori* у пациентов с хронической вирусной патологией печени // Кримський терапевтичний журнал. 2014. № 1. С. 162–171. [Klyaritskaya I.L., Krivoy V.V., Matrau S. The role of *Helicobacter pylori* in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis associate with HCV. *Krims'kii terapevtichnii zhurnal = Crimean Therapeutic Journal, 2014, no. 1, pp. 162–171. (In Russ.)*]
9. Князькина О.В. Микрофлора кишечника у больных вирусными гепатитами // Информационный архив. 2010. Т. 4, № 2. С. 130–131. [Knyazkina O.V. Intestinal microflora in patients with viral hepatitis. *Informatsionnyi arkhiv = Information Archive, 2010, vol. 4, no. 2, pp. 130–131. (In Russ.)*]
10. Порохницький В.Г., Топольницький В.С. Вірусні гепатити. Київ: Книга плюс, 2010. 425 р. [Porohnitsky V.G., Topolnitsky V.S. Virusni gepatiti [Viral hepatitis]. *Kiev: Book Plus, 2010. 425 p.*]
11. Радченко В.Г., Селиверстов П.В., Тетерина Л.А. Дисбиоз кишечника и хронические заболевания печени // Санкт-Петербургские врачебные ведомости. 2010. № 2. С. 61–65. [Radchenko V.G., Seliverstov P.V., Teterina L.A. Intestinal dysbiosis and chronic liver disease. *Sankt-Peterburgskie vrachebnye vedomosti = St. Petersburg Medical Statements, 2010, no. 2, pp. 61–65. (In Russ.)*]

12. Соловьева Н.В. Механизмы нарушений функций печени и микробиоценоза толстой кишки при хронических вирусных гепатитах В и С и их пробиотическая коррекция // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2014. Т. 1, № 8. С. 52–58. [Solovieva N.V. Mechanisms of violations of liver functions and colon microbiocenosis in chronic viral hepatitis B and C and their probiotic correction. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta = Scientific Notes of Petrozavodsk State University*, 2014, vol. 1, no. 8, pp. 52–58. (In Russ.)]
13. Ткач С.М., Левченко А.Р., Онищук Л.О. Инфекция *Helicobacter pylori* і позашлункові захворювання. Сучасна гастроентерологія. 2015. № 6 (86). С. 89–95. [Weaver S., Levchenko A.R., Onischuk L.A. *Helicobacter pylori* infection and out gastric disease. *Suchasna gastroenterologiya = Current Gastroenterology*, 2015, no. 6 (86), pp. 89–95.]
14. Шейбак В.М. Микробиом кишечника человека и его влияние на метаболизм // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2015. № 2. С. 37–43. [Sheibak V.M. Human intestinal microbiom and its effect on the metabolism. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Grodno State Medical University*, 2015, no. 2, pp. 37–43. (In Russ.)]
15. Abbeele P., Belzer C., Goossens M., Kleerebezem M., Vos W., Thas O., Weirtd R., Kerckhof F., Wiele T. Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.*, 2013, vol. 7, no. 5, pp. 949–961. doi: 10.1038/ismej.2012.158
16. Andoh A., Bamba T., Sasaki M. Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions. *J. Parent. Enteral. Nutr.*, 1999, vol. 23, pp. 70–73.
17. Avenaud P., Castoviejo M., Claret S., Mégraud F., Ménard A. Expression and activity of the cytotoxigenic distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 318, no. 3, pp. 739–745.
18. Belkaid Y., Hand T. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 2014, vol. 157, no. 1, pp. 121–141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011
19. Belkaid Y., Naik S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 7, pp. 646–653. doi:10.1038/ni.2604
20. Boettler T., Panther E., Bengsch B., Nazarova N., Spangenberg H.C., Blum H.E., Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 7, pp. 3532–3540. doi: 10.1128/JVI.80.7.3532-3540.2006
21. Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., Panther E., Urbani S., Ferrari C., Blum H.E., Weizsacker F., Timme R. T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, no. 12, pp. 7860–7867. doi: 10.1128/JVI.79.12.7860-7867.2005
22. Boni C., Fisticaro P., Valdatta C., Amadei B., Di Vincenzo P., Giuberti T., Laccabue D., Zerbin A., Cavalli A., Missale G., Bertoletti A., Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 8, pp. 4215–4225. doi: 10.1128/JVI.02844-06
23. Brogden K.A., Guthmiller J.M. Polymicrobial diseases. mixed infections of intestinal viruses and bacteria in humans. Ed. J.A. Marshall. *Washington (DC): ASM Press; 2002. 427 p.*
24. Chen Y., Yang F., Lu H., Wang B., Chen Y., Lei D., Wang Y., Zhu B., Li L. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 2011, vol. 54, no. 2, pp. 562–572. doi: 10.1002/hep.24423
25. Chou H.H., Chien W.H., Wu L.L., Cheng C.H., Chung C.H., Horng J.H., Ni Y.H., Tseng H.T., Wu D., Lu X.I., Wang H.Y., Chen P.J., Chen D.S. Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota. *PNAS*, 2015, vol. 112, no. 7, pp. 2175–2180. doi: 10.1073/pnas.1424775112
26. Cowie B.C., Carville K.S., MacLachlan J.H. Mortality due to viral hepatitis in the Global Burden of Disease Study 2010: new evidence of an urgent global public health priority demanding action. *Antivir. Ther.*, 2013, vol. 18, no. 8, pp. 953–954. doi: 10.3851/IMP2654
27. El-Masry S., El-Shahat M., Badra G., Aboel-Nour M., Lotfy M. *Helicobacter pylori* and hepatitis C virus coinfection in egyptian patients. *J. Glob. Infect. Dis.*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 4–9. doi: 10.4103/0974-777X.59244
28. Esmat G., El-Bendary M., Zakarya S., Ela M., Zalata K. Role of *Helicobacter pylori* in patients with HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma: possible association with disease progression. *J. Viral Hepat.*, 2012, vol. 19, no. 7, pp. 473–479. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01567.x
29. European Association for the Study of the Liver (EASL). Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*, 2012, vol. 57, no. 1, pp. 167–185. doi: 10.1016/j.hep.2012.02.010
30. Fagoonee S., Pellicano R., Rizzetto M., Ponzetto A. The journey from hepatitis to hepatocellular carcinoma. Bridging role of *Helicobacter* species. *Panminerva Med.*, 2001, vol. 43, no. 4, pp. 279–282.
31. Fisticaro P., Valdatta C., Massari M., Loggi E., Ravanetti L., Urbani S., Giuberti T., Cavalli A., Vandelli C., Andreone P., Missale G., Ferrari C. Combined blockade of programmed death-1 and activation of CD137 increase responses of human liver T cells against HBV, but not HCV. *Gastroenterology*, 2012, vol. 143, no. 6, pp. 1576–1585. doi: 10.1053/j.gastro.2012.08.041
32. Haque T.R., Barritt IV A.S. Intestinal microbiota in liver disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2016, vol. 30, no. 1, pp. 133–142. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.004
33. Hu C.E., Gan J., Zhang R.D., Cheng Y.R., Huang G.J. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2011, vol. 46, no. 2, pp. 156–164. doi: 10.3109/00365521.2010.516450
34. Kakiyama G., Hylemon P.B., Zhou H., Pandak W.M., Heuman D.M., Kang D.J., Takei H., Nittono H., Ridlon J.M., Fuchs M., Gurley E.C., Wang Y., Liu R., Sanyal A.J., Gillevet P.M., Bajaj J.S. Colonic inflammation and secondary bile acids in alcoholic cirrhosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2014, vol. 306, no. 11, pp. 929–937. doi: 10.1152/ajpgi.00315.2013

35. Kakiyama G., Pandak W.M., Gillevet P.M., Hylemon P.B., Heuman D.M., Daita K., Takei H., Muto A., Nittono H., Ridlon J.M., White M.B., Noble N.A., Monteith P., Fuchs M., Thacker L.R., Sikaroodi M., Bajaj J.S. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 2013, vol. 58, no. 5, pp. 949–955. doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.003
36. Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, no. 5, pp. 321–335. doi: 10.1038/nri3430
37. Kosiewicz M.M., Zirnheld A.L., Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2, article 180, pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2011.00180
38. Kostic A.D., Xavier R.J., Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 2014, vol. 146, no. 6, pp. 1489–1499. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.009
39. Krüttgen A., Horz H.P., Weber-Heynemann J., Vucur M., Trautwein C., Haase G., Luedde T., Roderburg C. Study on the association of helicobacter species with viral hepatitis-induced hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes.*, 2012, vol. 3, no. 3, pp. 228–233. doi: 10.4161/gmic.19922
40. Lee K., Kang J.Y., Shin H.S., Park I.H., Ha N.J. Antiviral activity of Bifidobacterium adolescentis SPM0212 against Hepatitis B virus. *Arch. Pharm. Res.*, 2013, vol. 36, no. 12, pp. 1525–1532. doi: 10.1007/s12272-013-0141-3
41. Li G., Guo G.L. Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration. *Acta Pharm. Sin. B*, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 93–98. doi: 10.1016/j.apsb.2015.01.005
42. Livesey G., Elia M. Short-chain fatty acids as an energy source in the colon: metabolism and clinical implications. Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Ed. Cummings J.Y., Rombeau J.L., Sakata T. *Cambridge University Press*, 2004, pp. 427–482.
43. Lu H., Wu Z., Xu W., Yang J., Chen Y., Li L. Intestinal microbiota was assessed in cirrhotic patients with hepatitis b virus infection: intestinal microbiota of HBV cirrhotic patients. *Microb. Ecol.*, vol. 61, no. 3, pp. 693–703. doi: 10.1007/s00248-010-9801-8
44. Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, no. 453, pp. 620–625. doi: 10.1038/nature07008
45. Minemura M., Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2015, vol. 21, no. 6, pp. 1691–1702. doi: 10.3748/wjg.v21.i6.1691
46. Miquel S., Martín R., Rossi O., Bermúdez-Humarán L.G., Chatel J.M., Sokol H., Thomas M., Wells J.M., Langella P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 255–261. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.003
47. Mirpuri J., Sotnikov I., Myers L., Denning T.L., Yarovinsky F., Parkos C.A., Denning P.W., Louis N.A. Lactobacillus rhamnosus (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 12, e. 51955. doi: 10.1371/journal.pone.0051955
48. Molloy M.J., Bouladoux N., Belkaid Y. Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin. Immunol.*, 2012, vol. 24, no. 1, pp. 58–66. doi: 10.1016/j.smim.2011.11.008
49. Neish A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 2009, vol. 136, no. 1, pp. 65–80. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.080
50. Pellicano R., Ménard A., Rizzetto M., Mégraud F. Helicobacter species and liver diseases: association or causation? *Lancet Infect. Dis.*, 2008, vol. 8, no. 4, pp. 254–260. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70066-5
51. Rai R., Saraswat V.A., Dhiman R.D. Gut microbiota: its role in hepatic encephalopathy. *J. Clin. Exp. Hepatol.*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.1016/j.jceh.2014.12.003
52. Ridlon J.M., Alves J.M., Hylemon P.B., Bajaj J.S. Cirrhosis, bile acids and gut microbiota. Unraveling a complex relationship. *Gut Microbes*, 2013, vol. 4, no. 5, pp. 382–387. doi: 10.4161/gmic.25723
53. Ridlon J.M., Bajaj J.S. The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm. Sin. B*, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 99–105. doi: 10.1016/j.apsb.2015.01.006
54. Rocha M., Avenaud P., Ménard A., Le Bail B., Balabaud C., Bioulac-Sage P., De Magalhães Queiroz D.M., Mégraud F. Association of Helicobacter species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2005, vol. 54, no. 3, pp. 396–401.
55. Roderburg C., Luedde T. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes*, 2014, vol. 5, no. 4, pp. 441–445. doi: 10.4161/gmic.29599
56. Schnabl B. Linking intestinal homeostasis and liver disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2013, vol. 29, no. 3, pp. 264–270. doi: 10.1097/MOG.0b013e32835ff948
57. Semmo N., Day C.L., Ward S.M., Lucas M., Harcourt G., Loughry A., Klenerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD4⁺ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology*, 2005, vol. 41, no. 5, pp. 1019–1028. doi: 10.1002/hep.20669
58. Shuai Z., Leung M., He X., Zhang W., Yang G., Leung P., Gershwin M. Adaptive immunity in the liver. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 354–368. doi: 10.1038/cmi.2016.4
59. Wei X., Yan X., Zou D., Yang Z., Wang X., Liu W., Wang S., Li X., Han J., Huang L., Yuan J. Abnormal fecal microbiota community and functions in patients with hepatitis B liver cirrhosis as revealed by a metagenomic approach. *BMC Gastroenterol.*, 2013, vol. 175, no. 13, pp. 175–185. doi: 10.1186/1471-230X-13-175
60. Wells J.E., Hylemon P.B. Identification and characterization of a bile acid 7 α -dehydroxylation operon in Clostridium sp. strain TO-931, a highly active 7 α -dehydroxylating strain isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, no. 3, pp. 1107–1113.
61. Wu Z.W., Lu H.F., Wu J., Zuo J., Chen P., Sheng J.F., Zheng S.S., Li L.J. Assessment of the fecal lactobacilli population in patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis and hepatitis B cirrhosis treated with liver transplant. *Microb. Ecol.* 2012, vol. 63, no. 4, pp. 929–937. doi: 10.1007/s00248-011-9945-1

62. Xu D., Huang Y., Wang J. Gut microbiota modulate the immune effect against hepatitis B virus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015, vol. 34, no. 11, pp. 2139–2147. doi: 10.1007/s10096-015-2464-0
63. Xu M., Wang B, Fu Y., Chen Y., Yang F., Lu H., Chen Y., Xu J., Li L. Changes of fecal Bifidobacterium species in adult patients with hepatitis B virus-induced chronic liver disease. *Microb. Ecol.*, 2012, vol. 63, no. 2, pp. 304–313. doi: 10.1007/s00248-011-9925-5
64. Zhou Z., Xu M.J., Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 301–315. doi: 10.1038/cmi.2015.97

Авторы:

Полищук Н.Н., к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

Камышный А.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина.

Authors:

Polishchuk N.N., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Head of Bacteriological Research Laboratory, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

Kamyshny A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Microbiology, Virology and Immunology, Head of Molecular Genetics Laboratory, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine.

Поступила в редакцию 08.07.2016
Отправлена на доработку 05.10.2016
Принята к печати 13.10.2016

Received 08.07.2016
Revision received 05.10.2016
Accepted 13.10.2016

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ИНГИБИТОРА МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

А.Г. Афиногенова^{1,2}, Т.М. Ворошилова³, Г.Е. Афиногенов², Д.Ю. Мадай²

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Устойчивость к антибиотикам среди микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* обусловлена комбинацией нескольких механизмов, например, гиперпродукцией бета-лактамаз, снижением проницаемости внешней мембраны микробной клетки (обычно это связано с утратой пориновых белков), наличием системы эффлюкса. Особого внимания заслуживают металло-бета-лактамазы (МБЛ), наличие которых обуславливает устойчивость грамотрицательных микроорганизмов ко всем бета-лактамам антибиотикам (в некоторых случаях, кроме азтреонама). В настоящее время нет ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных для применения в клинике. Поиск эффективных ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных к применению в клинике и усиливающих действие карбапенемов, послужил основанием для выполнения данного исследования. Работу проводили в 3 этапа: 1) создание модельной системы с использованием стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, для оценки повышения минимальных подавляющих концентраций (МПК) карбапенемов в отношении ранее чувствительных к ним штаммов грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*; 2) оценка эффективности перспективных ингибиторов МБЛ в присутствии того же стандартного реактива фермента; 3) оценка способности выявленных ингибиторов усиливать действие карбапенемов в отношении клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МБЛ, по показателям МПК и индекса фракционной ингибирующей концентрации (ФИК). Стандартный метод «шахматной доски» модифицировали для оценки сочетанного применения антибиотика из группы карбапенемов и потенциального ингибитора МБЛ — лекарственного препарата из группы бисфосфонатов — этидроновой кислоты. С использованием стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, создали модельную систему, которая позволяет оценить перспективность новых ингибиторов МБЛ грамотрицательных микроорганизмов. Выявлен дозозависимый эффект повышения уровня МПК меропенема от количества реактива МБЛ в модельной системе в отношении ранее чувствительных к антибиотику референс-штаммов микроорганизмов. Отмечена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната, в исследованиях показана задержка появления логарифмической фазы роста тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали МБЛ, наблюдали отсутствие логарифмической фазы роста микроба за счет действия меропенема на уровне референтного значения чувствительности (2 мкг/мл). Выявлено синергидное действие (индекс ФИК < 0,5) соче-

Адрес для переписки:

Афиногенова Анна Геннадьевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 557-88-94 (моб.). Факс: 8 (812) 232-92-17.
E-mail: spbtestcenter@mail.ru

Contacts:

Anna G. Afinogenova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 557-88-94 (mobile). Fax: +7 (812) 232-92-17.
E-mail: spbtestcenter@mail.ru

Библиографическое описание:

Афиногенова А.Г., Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Мадай Д.Ю.
Оценка эффективности нового ингибитора металло-бета-лактамазы
в условиях модельной системы *in vitro* // Инфекция и иммунитет. 2016.
Т. 6, № 4. С. 335–344. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-335-344

Citation:

Afinogenova A.G., Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Maday D.Yu. The new
metall-beta-lactamase's inhibitor efficacy in a model system *in vitro* //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016,
vol. 6, no. 4, pp. 335–344. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-335-344

танного применения меропенема с этидроновой кислотой в отношении клинических резистентных к карбапенемам изолятов грамотрицательных микроорганизмов, при этом показано усиление действия антибиотика в 8–512 раз по сравнению с исходным уровнем МПК.

Ключевые слова: металло-бета-лактамаза (МБЛ), карбапенемрезистентные грамотрицательные микроорганизмы, ингибиторы МБЛ, бисфосфонаты, этидроновая кислота, метод «шахматной доски».

THE NEW METALL-BETA-LACTAMASE'S INHIBITOR EFFICACY IN A MODEL SYSTEM *IN VITRO*

Afinogenova A.G.^{a,b}, Voroshilova T.M.^c, Afinogenov G.E.^b, Maday D.Yu.^b

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c The Nikiforov All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The *Enterobacteriaceae* antibiotics resistance depends on a combination of several mechanisms, such as the beta-lactamases overproduction, the microbial cell reduction outer membrane permeability (usually associated with loss of protein porin), the presence of efflux systems. Particularly noteworthy are the metallo-beta-lactamases (MBL) whose presence causes resistance of gram-negative microorganisms to all beta-lactam antibiotics (in some cases except aztreonam). Currently there are no MBL inhibitors permitted for use in the clinic. The effective inhibitors search for carbapenem-resistant bacteria' MBL authorized for use in the clinic and reinforcing effects of carbapenems, served as the basis for the present study. The work was carried out in three stages: 1) creating a model system using a standard enzyme reagent metallo-beta-lactamase *P. aeruginosa* recombinant expressed in *E. coli*, to evaluate the increasing of minimal inhibitory concentrations (MIC) of carbapenems against previously sensitive Gram-negative microorganisms strains *in vitro*; 2) evaluation of MBL promising inhibitors in the presence of the same standard enzyme reagent; 3) evaluation of the ability of the identified inhibitors increase the carbapenems effects against clinical isolates of Gram-negative microorganisms producing MBL, in terms of the their MIC and fractional inhibitory concentration index (FIC index). The checkerboard array was modified to evaluate the combined use of carbapenems and potential MBL inhibitor — a drug from the group of bisphosphonates — etidronic acid. Using a standard enzyme reagent metallo-beta-lactamase *P. aeruginosa* recombinant expressed in *E. coli*, we created a model system that allows to assess the prospects of new inhibitors MBL gram-negative microorganisms. A dose-dependent effect of increasing the meropenem level MIC from reagent MBL quantity in a model system against previously antibiotic sensitive reference strains of microorganisms was revealed. MBL enzyme inactivation was noted in the presence of even small doses of bisphosphonate, in the tests the appearance of logarithmic phase of *P. aeruginosa* ATCC 27853 growth was shown delayed up to 12 hours compared to the control. In this case the maximum dose of etidronic acid 50 000–100 000 µg/ml completely inhibited the MBL, there was no a log phase microbe's growth due to the effect of meropenem on the reference level of sensitivity (2 µg/ml). The synergistic effect (FIC index < 0.5) of combined meropenem with etidronic acid use was identified against clinical isolates Gram-negative microorganisms resistant to carbapenems and producing MBL, wherein the enhancing action of the antibiotic was more 8–512 times compared with the initial MIC levels.

Key words: metall-β-lactamase (MBL), carbapenem-resistant Gram-negative bacteria, inhibitors of MBL, bisphosphonates, etidronic acid, checkerboard array.

Введение

Одной из причин развития внутрибольничных инфекций является рост числа антибиотикорезистентных возбудителей инфекции на фоне нерационального применения антибиотиков [2, 4, 5, 27]. Устойчивость к ним среди микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* обусловлена комбинацией нескольких механизмов, например, гиперпродукцией бета-лактамаз, снижением проницаемости внешней мембраны микробной клетки (обычно это связано с утратой пориновых белков), наличием системы эффлюкса [13, 14, 34, 35, 38].

В результате мониторинга микробиоты отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), отделений хирургического профиля в последние годы среди выявленных изоля-

тов грамотрицательных микроорганизмов наблюдают нарастание количества резистентных к карбапенемам (с 20 до 90%) [6, 7, 16, 17, 18, 20, 24]. Особого внимания заслуживают металло-бета-лактамазы (МБЛ), наличие которых обуславливает устойчивость грамотрицательных микроорганизмов ко всем бета-лактамам антибиотикам (в некоторых случаях, кроме азтреонама) [11, 19, 25].

В связи с возросшей частотой выделения изолятов грамотрицательных микроорганизмов, резистентных к карбапенемам, актуальным остается поиск способов усиления действия антибиотиков этого класса [10, 12, 15, 30]. Одним из возможных способов усиления действия карбапенемов является их комбинация с препаратами — эффективными ингибиторами МБЛ [1, 8, 23]. К сожалению, в настоящее время ин-

гибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных для применения в клинике, нет. Лечение таких нозокомиальных инфекций традиционными схемами неэффективно; для терапии, как правило, подбирают комбинации антибиотиков из 2–3, а иногда и 4-х препаратов [22, 26, 29, 33, 36, 37].

Поиск эффективных ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных к применению в клинике и усиливающих действие карбапенемов, послужил основанием для выполнения данного исследования. Работу проводили в 3 этапа: 1) создание модельной системы с использованием стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, для оценки повышения МПК карбапенемов в отношении ранее чувствительных к ним штаммов грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*; 2) оценка эффективности перспективных ингибиторов МБЛ в присутствии того же стандартного реактива фермента; 3) оценка способности выявленных ингибиторов усиливать действие карбапенемов в отношении клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МБЛ.

Материалы и методы

Для оценки повышения уровня МПК меропенема использовали чувствительные к нему (МПК 2 мкг/мл) референс-штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC ВАА-747. Для получения инокуляма тест-штаммов готовили исходную суспензию суточной культуры соответствующего микроба по стандарту 0,5 McFarland, далее суспензию разводили в 31 раз в бульоне Мюллера–Хинтон, при этом полученная взвесь содержала 5×10^6 КОЕ/мл. Конечная нагрузка референс-штаммов составила 5×10^4 КОЕ в 200 мкл, экспозиция 24 ч.

Для определения активности фермента в отношении меропенема (в дозах 2–512 мкг/мл) использовали микрометод перекрестного титрования («шахматной доски»), который был предложен для тестирования чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию двух антибиотиков [11, 28]. В наших исследованиях данный метод модифицирован для моделирования приобретения устойчивости микроорганизмами, а также для оценки эффективности сочетанного действия карбапенема и потенциального ингибитора МБЛ. Каждая ячейка обозначена на пересечении номера ряда и соответствующей буквы. Стандартную упаковку реактива фермента МБЛ, содержащую 1469 единиц активности, разводили в 13,12 мл стерильной дистиллированной воды, получая содержание 112 единиц активности МБЛ в 1 мл раствора.

В качестве потенциального ингибитора МБЛ изучали лекарственное средство из группы бисфосфонатов: отечественный препарат «Ксидифон» (этидроновая кислота, или (1-гидроксиэтилиден)бис[фосфоновая] кислота) производства ООО «Мосхимфармпрепараты», который из исходного 20% концентрата титровали методом серийных разведений. Подавление фермента МБЛ бисфосфонатом и, как следствие, отсутствие роста тест-штаммов подтверждали в микроячейках, а также на ридере ELx800 (Bio-Tek Instruments Inc., США). Измерение проводили при двух длинах волн (490 и 630 нм) при экспозициях от 4 до 24 часов; при бихроматическом измерении значение оптической плотности является разницей двух измерений, при этом значительно снижается погрешность результатов, вызванная царапинами или отпечатками пальцев на планшете.

Для оценки способности выявленного ингибитора усиливать действие меропенема в отношении грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МБЛ, использовали клинические резистентные изоляты *P. aeruginosa* 532/14 (МПК меропенема 512 мкг/мл), у которого фенотипически (методом Е-теста) и генотипически (методом ПЦР) подтвердили наличие МБЛ генотипа VIM, а также *A. baumannii* 346/14 (МПК меропенема 128 мкг/мл), при генотипировании которого МБЛ не обнаружена, но подтверждено ее наличие фенотипически с помощью Е-теста с ЭДТА [3]. МПК этидроновой кислоты составила 200 мг/мл. В опытах оставляли ячейку К1 — контроль роста тест-штамма и ячейку К2 — контроль среды и отсутствие роста. Разведение в ячейке, содержимое которой было прозрачным, считали МПК препаратов после высева на плотную питательную среду и получения роста тест-штамма.

Все опыты проводили в 96-луночных микропланшетах одновременно в трех повторностях, результаты подвергали статистической обработке по Фишеру–Стьюденту с вычислением доверительного интервала.

Результаты

Для определения активности стандартного реактива фермента МБЛ в отношении карбапенемов в присутствии чувствительных референс-штаммов использовали титрование микрометодом из начальной дозы 0,112 ед. акт. в 1 мкл. В опыты брали объем реактива МБЛ 5 мкл с дозой 0,56 ед. акт., из которой в среде Мюллера–Хинтон раститровывали фермент до дозы 0,0022 ед. акт. Для модификации метода «шахматной доски» в ячейки, содержащие по 92,5 мкл разведения меропенема, вносили по 92,5 мкл среды Мюллера–Хинтон, добавляли по 5 мкл разведения реактива МБЛ и по 10 мкл микробной взвеси.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИНАКТИВАЦИИ МЕРОПЕНЕМА В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ ДОЗ СТАНДАРТНОГО РЕАКТИВА МБЛ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *P. AERUGINOSA* ATCC 27853

| № ряда | Количество фермента МБЛ, ед. акт. в ячейке | Количество меропенема, мкг/мл | | | | | | | | | |
|--------|--|--|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|
| | | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 |
| | | Наличие роста тест-культуры (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05) | | | | | | | | | |
| 1 | 0,28 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 2 | 0,14 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 3 | 0,07 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 4 | 0,035 | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 5 | 0,0175 | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 6 | 0,0088 | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 7 | 0,0044 | – | – | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р |
| 8 | 0,0022 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | Р |
| | | А | Б | В | Г | Д | Е | Ж | З | И | К |

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853; «–» — отсутствие роста.

В таблице 1 представлены результаты инактивации меропенема в присутствии реактива МБЛ в отношении тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853. Фермент в рядах 1–3 полностью инактивировал антибиотик, при этом наблюдали рост тест-штамма. Начиная с 4-го ряда, интенсивность инактивации ферментом снижалась, и в 8-м ряду отмечали отсутствие роста тест-культуры до уровня референтного значения чувствительности по EUCAST-2016 — 2 мкг/мл.

В таблице 2 представлены результаты инактивации меропенема в присутствии реактива МБЛ в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747. Показано, что фермент в рядах 1–4 полностью инактивировал антибиотик в количестве от 1 до 512 мкг/мл, при этом в ячейках наблюдали рост тест-штамма. Начиная с 5-го ряда, интенсивность инактивации фермента снижалась, и в 8-м ряду отмечали отсутствие роста тест-культуры до уровня референтного значения чувствительности — 2 мкг/мл.

Результаты исследования показали дозозависимый эффект повышения уровня МПК меропенема в отношении ранее чувствительных к нему штаммов грамотрицательных микроорганизмов в зависимости от количества стандартного реактива МБЛ в модельной системе. При этом в каждом опыте наблюдали разное количество реактива МБЛ, которое приводило к максимальным значениям уровня МПК меропенема: в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853 — 0,07 ед. акт., *A. baumannii* ATCC ВАА-747 — 0,035 ед. акт. Можно предположить, что это связано со скоростью генерации этих бактерий в присутствии антибиотика.

В дальнейшем в созданной модельной системе проводили оценку эффективности сочетанного применения антибиотика и потенциального ингибитора МБЛ из группы бисфосфонатов в отношении чувствительных к меропенему грамотрицательных микроорганизмов в присутствии стандартного реактива МБЛ. В опыт брали максимальную дозу МБЛ 0,28 ед. акт.,

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИНАКТИВАЦИИ МЕРОПЕНЕМА В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ ДОЗ СТАНДАРТНОГО РЕАКТИВА МБЛ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *A. BAUMANNII* ATCC ВАА-747

| № ряда | Количество фермента МБЛ, ед. акт. в ячейке | Количество меропенема, мкг/мл | | | | | | | | | |
|--------|--|--|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|
| | | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 |
| | | Наличие роста тест-культуры (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05) | | | | | | | | | |
| 1 | 0,28 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 2 | 0,14 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 3 | 0,07 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 4 | 0,035 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 5 | 0,0175 | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 6 | 0,0088 | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 7 | 0,0044 | – | – | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р |
| 8 | 0,0022 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | Р |
| | | А | Б | В | Г | Д | Е | Ж | З | И | К |

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747; «–» — отсутствие роста.

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ МБЛ ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ В КОМПОЗИЦИИ С МЕРОПЕНЕМОМ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *P. AERUGINOSA* ATCC 27853

| № ряда | Количество этидроновой кислоты, мкг/мл | Количество меропенема, мкг/мл | | | | | | | | | |
|--------|--|---|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|
| | | 0 | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 |
| | | Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05) | | | | | | | | | |
| 1 | 0 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 2 | 1563 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 3 | 3125 | Р | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р |
| 4 | 6250 | Р | – | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р |
| 5 | 12 500 | Р | – | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р |
| 6 | 25 000 | Р | – | – | – | – | – | – | – | Р | Р |
| 7 | 50 000 | Р | – | – | – | – | – | – | – | – | Р |
| 8 | 100 000 | Р | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | | А | Б | В | Г | Д | Е | Ж | З | И | К |

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии субстрата МБЛ; «–» — отсутствие роста.

которая инактивирует максимальную тестируемую концентрацию антибиотика 512 мкг/мл. В ячейки, содержащие по 92,5 мкл разведения антибиотика, вносили по 92,5 мкл разведения этидроновой кислоты, затем добавляли по 5 мкл разведения реактива МБЛ 0,28 ед.акт. и по 10 мкл микробной взвеси.

В таблице 3 представлены результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в композиции с меропенемом в отношении тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853. В ячейках, где отсутствовал бисфосфонат, выявляли рост тест-штамма за счет инактивации антибиотика ферментом МБЛ (ячейка А1 — контроль культуры). Начиная с 3-го ряда наблюдали отсутствие роста тест-штамма в тех ячейках, где выявлен эффект ингибирования МБЛ этидроновой кислотой, что позволило меропенему проявить свой эффект.

В таблице 4 представлены результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в ком-

бинации с меропенемом в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747. В ячейках без этидроновой кислоты отмечали рост тест-штамма за счет инактивации антибиотика ферментом МБЛ. Эффект ингибитора был отмечен со 2-го ряда, где его содержание составило 1563 мкг/мл. В ряду 8 выявлен эффект полной инактивации МБЛ этидроновой кислотой и отсутствие роста тест-культуры с дозами антибиотика до уровня референтного значения чувствительного тест-штамма — 2 мкг/мл.

На рисунке представлены кривые роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии реактива МБЛ (0,28 ед.акт.) при воздействии меропенема (2 мкг/мл) в сочетании с разными дозами этидроновой кислоты. Каждые 4 ч инкубации планшетов снимали показания оптической плотности микробной взвеси на ридере (n = 3, P < 0,05). Контролем служила смесь антибиотика, МБЛ и инокулята, в котором фермент подавлял активность меропенема, и при этом

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ МБЛ ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ В КОМБИНАЦИИ С МЕРОПЕНЕМОМ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *A. BAUMANNII* ATCC ВАА-747

| № ряда | Количество этидроновой кислоты, мкг/мл | Количество меропенема, мкг/мл | | | | | | | | | |
|--------|--|---|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|
| | | 0 | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 |
| | | Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05) | | | | | | | | | |
| 1 | 0 | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 2 | 1563 | Р | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 3 | 3125 | Р | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 4 | 6250 | Р | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р | Р |
| 5 | 12 500 | Р | – | – | – | – | Р | Р | Р | Р | Р |
| 6 | 25 000 | Р | – | – | – | – | – | – | Р | Р | Р |
| 7 | 50 000 | Р | – | – | – | – | – | – | – | – | Р |
| 8 | 100 000 | Р | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | | А | Б | В | Г | Д | Е | Ж | З | И | К |

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747 в присутствии субстрата МБЛ; «–» — отсутствие роста.

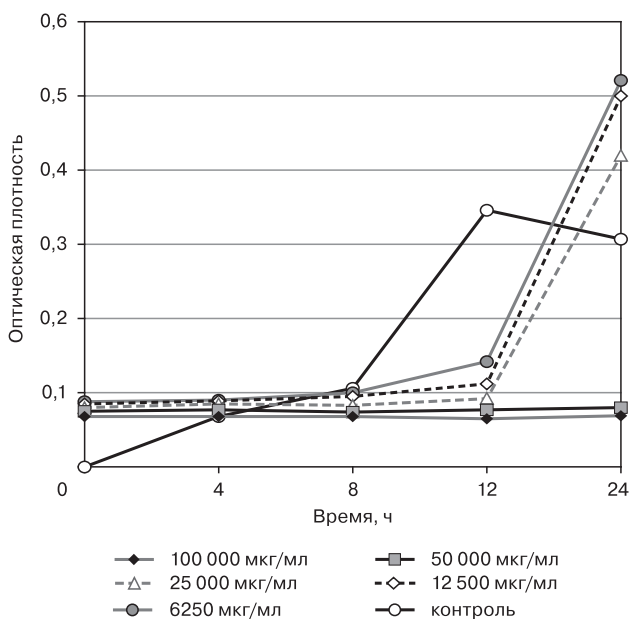


Рисунок. Динамика роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии реактива МБЛ (0,28 ед. акт.) при воздействии сочетаний меропенема (2 мкг/мл) с разными концентрациями этидроновой кислоты

Примечания. Выявлена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната, показана задержка появления логарифмической фазы роста тест-культуры до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали МБЛ, наблюдали отсутствие логарифмической фазы роста микроба за счет действия меропенема на уровне референтного значения чувствительности.

наблюдала появление логарифмической фазы роста тест-штамма с начала эксперимента. Выявлена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната, показана задержка появления логарифмической фазы роста тест-

культуры до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали МБЛ; наблюдали отсутствие логарифмической фазы роста микроба за счет действия меропенема на уровне референтного значения чувствительности.

При обосновании заключения об усилении действия меропенема в отношении резистентных клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов в присутствии этидроновой кислоты методом «шахматной доски» оценивали индекс фракционной ингибирующей концентрации (ФИК) по формуле:

$$\Sigma \text{ФИК} = \frac{\text{МПК}_{\text{ac}}}{\text{МПК}_a} + \frac{\text{МПК}_{\text{bc}}}{\text{МПК}_b},$$

где МПК_{ac} — минимальная концентрация антибиотика (в мкг/мл), взятого в сочетании с бисфосфонатом;

МПК_a — минимальная подавляющая концентрация антибиотика, взятого как монопрепарат (в мкг/мл);

МПК_{bc} — минимальная концентрация бисфосфоната (в мкг/мл), взятого в сочетании с антибиотиком;

МПК_b — минимальная подавляющая концентрация бисфосфоната, взятого как монопрепарат (в мкг/мл).

Авторами метода [28] предложена следующая трактовка индекса:

- синергизм — индекс до 0,5;
- индифферентность — индекс от 0,51 до 4;
- антагонизм — индекс более 4.

При использовании сочетаний этидроновой кислоты с меропенемом в отношении резистентного клинического изолята *P. aeruginosa* 532/14 выявлены следующие закономерности (табл. 5). В ячейке ДЗ выявлено минимальное увеличение чувствительности *P. aeruginosa*

ТАБЛИЦА 5. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСТОЙЧИВОГО ШТАММА *P. AERUGINOSA* 532/14 (МПК МЕРОПЕНЕМА 512 мкг/мл) К СОЧЕТАННОМУ ДЕЙСТВИЮ МЕРОПЕНЕМА И ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

| | Этидроновая кислота, мкг/мл | Меропенем, мкг/мл | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|-------------------|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----|
| | | 0 | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | |
| 1 | 0 | K1 | – | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P |
| 2 | 781 | P | – | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P |
| 3 | 1563 | P | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P | P |
| 4 | 3125 | P | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P | P |
| 5 | 6250 | P | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P | P |
| 6 | 12 500 | P | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P | P |
| 7 | 25 000 | P | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 8 | 50 000 | P | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 9 | 100 000 | P | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | K2 |
| | | А | Б | В | Г | Д | Е | Ж | З | И | К | Л | |

Примечание: «P» — рост тест-культуры *P. aeruginosa* 532/14; «–» — отсутствие роста; K1 — контроль культуры, рост есть; K2 — контроль питательной среды, роста нет.

ТАБЛИЦА 6. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *A. baumannii* 346/14 (МПК МЕРОПЕНЕМА 512 мкг/мл) К СОЧЕТАННОМУ ДЕЙСТВИЮ МЕРОПЕНЕМА И ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

| | Этидроновая кислота, мкг/мл | Меропенем, мкг/мл | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|-------------------|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----|
| | | 0 | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | |
| 1 | 0 | K1 | – | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P |
| 2 | 781 | P | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P | P |
| 3 | 1563 | P | – | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P |
| 4 | 3125 | P | – | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P |
| 5 | 6250 | P | – | – | – | – | – | P | P | P | P | P | P |
| 6 | 12 500 | P | – | – | – | – | – | – | – | P | P | P | P |
| 7 | 25 000 | P | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 8 | 50 000 | P | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 9 | 100 000 | P | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | K2 |
| | | A | Б | В | Г | Д | Е | Ж | З | И | К | Л | |

Примечание: «P» — рост тест-культуры *A. baumannii* 346/14; «-» — отсутствие роста, K1 — контроль культуры, роста есть, K2 — контроль питательной среды, роста нет.

532/14 к меропенему в 8 раз при сочетании с дозой этидроновой кислоты равной 1/128 МПК. Индекс ФИК составил 0,12, синергидный эффект. Необходимо отметить увеличение чувствительности тест-культуры к меропенему в 512 раз при сочетании с дозой бисфосфоната равной 1/8 МПК (ячейка Л7). Индекс ФИК при этом составил 0,12 (синергидный эффект).

В другой группе опытов изучали сочетанное действие бисфосфоната и меропенема в отношении тест-штамма *A. baumannii* 346/14 (табл. 6). Наблюдали усиление действия меропенема в 8 раз при сочетании с этидроновой кислотой в дозе 1/256 МПК (ячейка Д2). Индекс ФИК составил 0,13 (синергидный эффект). При сочетанном использовании препарата в дозе 1/8 МПК получили усиление действия меропенема в 512 раз (ячейка Л7), при этом индекс ФИК равен 0,13 (синергидный эффект).

Таким образом, выявлено синергидное действие бисфосфоната — этидроновой кислоты и меропенема в отношении резистентных штаммов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14, продуцирующих МБЛ. Результаты 3 этапа наших исследований демонстрируют снижение высокого уровня резистентности к карбапенемам клинических штаммов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14 в присутствии этидроновой кислоты в 8–512 раз (синергидный эффект).

Обсуждение и выводы

Во многом гидролитическая инактивация карбапенемов зависит от активности и количества МБЛ, образуемого микробом. Известны следующие ингибиторы МБЛ: этилендиаминотетраацетат [23], пиколиновая и малеиновая кислоты и их производные [8, 9]. В настоящее время не существует ингибиторов МБЛ из числа лекарственных средств, применяемых в клинике. В наших ранних работах изучена

возможность ингибирования МБЛ карбапенемрезистентных грамотрицательных микроорганизмов лекарственным средством из группы бисфосфонатов — клодроновой (дихлорметиленибисфосфоновой) кислотой, в дальнейшем изучали отечественный препарат — этидроновую кислоту.

Наиболее признанным, чаще применяемым способом определения чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию двух антибиотиков является метод «шахматной доски», или перекрестного титрования. Кроме того, есть ряд работ по оценке наличия синергизма или антагонизма антибиотика и антимикробных агентов из групп четвертичных аммониевых соединений, ЭДТА [21, 31, 32, 39].

Мы модифицировали методику для оценки эффективности сочетанного применения антибиотика из группы карбапенемов и потенциального ингибитора МБЛ грамотрицательных бактерий.

На первом этапе данного исследования изучено повышение уровня МПК карбапенема в отношении ранее чувствительных к нему грамотрицательных бактерий в зависимости от дозы стандартного реактива МБЛ *P. aeruginosa*.

Полученные результаты позволили в дальнейшем в разработанной модельной системе изучить возможность потенциального ингибитора МБЛ — этидроновой кислоты, инактивировать стандартный реактив фермента и повышать эффективность меропенема в отношении ранее чувствительных к антибиотику грамотрицательных микробов. Выявлена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната. На ридере ELx800 показана задержка логарифмической фазы роста тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали стандартный реак-

тив фермента МБЛ на протяжении 24 часов, что позволило меропенему проявить свою активность в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 на уровне референтного значения чувствительности.

Результаты 3 этапа исследований демонстрируют синергидный эффект сочетанного применения этидроновой кислоты и меропенема в отношении клинических изолятов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14, продуцирующих МБЛ, с высоким уровнем резистентности к карбапенемам. При этом показано усиление действия меропенема по показателям его МПК в 8–512 раз, поэтому можно считать доказанным, что этидроновая кислота способна ингибировать МБЛ резистентных грамотрицательных микроорганизмов.

Таким образом, метод «шахматной доски» использован для создания модельной системы

с применением стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, для оценки эффективности потенциальных ингибиторов МБЛ. На разработанной модели показана способность отечественного лекарственного препарата этидроновой кислоты ингибировать МБЛ клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов, снижая при этом уровень МПК меропенема до референтного значения чувствительности.

Благодарности

Авторы выражают большую благодарность сотрудникам лаборатории бактериологических исследований ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России за помощь в проведении данного исследования.

Список литературы/References

1. Агеев В.А., Лазарева И.В., Сидоренко С.В. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения // Фарматека. 2015. № 14 (307). С. 9–16. [Ageevets V.A., Lazareva I.V., Sidorenko S.V. The problem of resistance to carbapenems: carbapenemases spread in the world and Russia, epidemiology, diagnosis, treatment options. *Farmateka = Pharmateka*, 2015, no. 14 (307), pp. 9–16. (In Russ.)]
2. Агеев В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С., Батыршин И.М., Попенко Л.Н., Шляпников С.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58, № 3–4. С. 10–13. [Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsina E.S., Baturshin I.M., Popenko L.N., Shlyapnikov S.A., Ilyina E.N., Sidorenko S.V. Susceptibility of gram-negative carbapenemase-producing bacteria to various group antibiotics. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2013, vol. 58, no. 3–4, pp. 10–13. (In Russ.)]
3. Афиногенова А.Г., Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Родионов Г.Г. «Метод шахматной доски» как тест для оценки снижения уровня резистентности грамотрицательных микроорганизмов к карбапенемам в присутствии бисфосфоната // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015. Т. 17, № 1. С. 24–32. [Afinogenova A.G., Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Rodionov G.G. «Checkerboard array» as a test for evaluation of decrease in gram-negative bacteria resistance to carbapenems in the presence of bisphosphonate. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 24–32. (In Russ.)]
4. Белобородов В.В. Дезэскалационная антибактериальная терапия — концепция повышения эффективности лечения тяжелых инфекций // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12, № 5. С. 3–7. [Beloborodov V.V. De-escalation antibiotic therapy — concept improve the efficiency of the treatment of severe infections. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2004, vol. 12, no. 5, pp. 3–7. (In Russ.)]
5. Военно-полевая хирургия. Национальное руководство. Под ред. И.Ю. Быкова, Н.А. Ефименко, Е.К. Гуманенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 816 с. [Voенno-polevaya khirurgiya. Natsional'noe rukovodstvo. Pod red. I.Yu. Bykova, N.A. Efimenko, E.K. Gumanenko [Military field surgery. National guidance. Eds.: Bykov I.Yu., Efimenko N.A., Gumanenko E.K.]. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2009. 816 p.]
6. Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Афиногенова А.Г., Мадай Д.Ю. Мониторинг ведущей микробиоты — возбудителей инфекционно-септических заболеваний в хирургии. Проблемы медицинской микологии. 2016. Т. 18, № 2. С. 52–53. [Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Afinogenova A.G., Maday D.Yu. Monitoring of leading microbiota — dominant agents of surgical infectious and septic diseases. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2016, vol. 18, no. 2, pp. 52–53. (In Russ.)]
7. Гельфанд Б.Р., Белоцерковский Б.З., Милукова И.А., Гельфанд Е.Б., Попов Т.В., Проценко Д.Н., Чурадзе Б.Т. Эпидемиологический мониторинг нозокомиальных инфекций // Инфекции в хирургии. 2013. Т. 11, № 1. С. 5–10. [Gelfand B.R., Belotserkovskiy B.Z., Milukova I.A., Gelfand E.B., Popov T.V., Protsenko D.N., Churadze B.T. Epidemiological monitoring of nosocomial infections. *Infektsii v khirurgii = Infections in Surgery*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 5–10. (In Russ.)]
8. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С., Ведерникова Н.Б., Морозова О.Т., Смирнова М.В., Попенко Л.Н., Любушкина М.И., Савочкина Ю.А., Макарова М.А., Сузаева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльяг С., Мицюлявичене И., Балде А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-β-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 29–36. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konovalenko I.B., Pyasetskaya M.F., Kurchikova T.S., Vedernikova N.B., Morozova O.T., Smirnova M.V., Popenko L.N., Lubushkina M.I., Savochkina J.A., Makarova M.A., Suzhaeva L.V., Ostankova Ju.V.,

- Ivanova M.N., Pavelkovich A.M., Naaber P., Sepp E., Kõljalg S., Miciuleviciene J., Balode A. Enterobacteriaceae, producing ESBLs and metallo- β -lactamase NDM-1, isolated in hospitals of Baltic region countries. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-29-36 (In Russ.)
9. Патент 2462450 Российская Федерация, МПК C07C51/41, C07C57/42, C07C59/42, C07C69/60, C07C215/74, C07C219/02, C07C279/08, C07D207/02, C07D233/02, C07D241/08, A61K31/194, A61K31/341, A61K31/495, A61K45/08, A61K47/08, A61P31/04. Ингибиторы металло- β -лактамаз / Тикаути К., Ида М., Абе Т., Хирайва Ю., Морианака А., Кудо Т.; заявитель и патентообладатель Мейдзи Сейка Кайся, ЛТД. (JP). № 2008115512/04; заявл. 22.09.2006; опубл. 27.09.2012. [Patent 2462450 Russian Federation, IPC C07C51/41, C07C57/42, C07C59/42, C07C69/60, C07C215/74, C07C219/02, C07C279/08, C07D207/02, C07D233/02, C07D241/08, A61K31/194, A61K31/341, A61K31/495, A61K45/08, A61K47/08, A61P31/04. Inhibitory metallo- β -laktamaz [Metallo- β -lactamases inhibitors] / Tikauti K., Ida M., Abe T., Khiraiva Yu., Morinaka A., Kudo T.; appl. and patent holder Meidzi Seika Kaisya, Ltd. (JP). No. 2008115512/04; stat. 22.09.2006; publ. 27.09.2012]
 10. Поляк М.С. Антибиотикотерапия проблемных инфекций (преодоление резистентности). СПб.: Нестор-История, 2015. 488 с. [Polyak M.S. Antibiotikoterapiya problemnykh infektsii (preodolenie rezistentnosti) [Problem infections antibiotics therapy (resistance overcome)]. *St. Petersburg: Nestor-History*, 2015. 488 p.]
 11. Поляк М.С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии. СПб.: ООО «Анатолия», 2012. 256 с. [Polyak M.S. Laboratornoe obespechenie antibiotikoterapii [Antibiotic therapy laboratory support]. *St. Petersburg: Anatolia Ltd.*, 2012. 256 p.]
 12. Практическое руководство по антиинфекционной терапии. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Смоленск: МАКМАХ, 2007. 464 с. [Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoi terapii. Pod red. L.S. Strachunskogo, Yu.B. Belousova, S.N. Kozlova [Practical manual on anti-infective therapy. Eds. Strachunsky L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N.]. *Smolensk: IACMAC*, 2007. 464 p.]
 13. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1. Под ред. Лабинской А.С., Воиной Е.Г. М.: Издательство БИНОМ, 2008. 1080 с. [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya. Kniga 1. Pod red. Labinskoi A.S., Volinoy E.G. [Medical microbiology guide. General and sanitary microbiology. Book 1. Eds. Labinskaya A.S., Volina E.G.]. *Moscow: Publishing house "BINOM"*, 2008. 1080 p.]
 14. Сидоренко С.В., Партина И.В., Агеевец В.А. Имипенем: 30 лет терапии // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58, № 5–6. С. 55–61. [Sidorenko S.V., Partina I.V., Ageevets V.A. Imipenem: 30-year experience in therapy. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2013, vol. 58, no. 5–6, pp. 55–61. (In Russ.)]
 15. Тренин А.С. Методология поиска новых антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60, № 7–8. С. 34–46. [Trenin A.S. Methodology of screening new antibiotics: present status and prospects. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2015, vol. 60, no. 7–8, pp. 34–46. (In Russ.)]
 16. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7, № 3. С. 271–285. [Schagenyan I.A., Tchernukha M.Ju. Nosocomial infections caused by non-fermenting gram-negative bacteria: epidemiological, microbiological and clinical features. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, vol. 7, no. 3, pp. 271–285. (In Russ.)]
 17. Щербук Ю.А., Мадай Д.Ю., Щербук А.Ю., Гармашов Ю.А., Мадай О.Д., Никитина Е.А. Комплексный подход к оценке тяжести состояния у больных с гнойно-воспалительными одонтогенными заболеваниями // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2014. Т. 173, № 5. С. 16–22. [Shcherbuk Yu.A., Madai D.Yu., Shcherbuk A.Yu., Garmashov Yu.A., Madai O.D., Nikitina E.A. Complex approach to assessment of condition severity in patients with pyoinflammatory odontogenous diseases. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Surgery Herald n.a. I.I. Grekov*, 2014, vol. 173, no. 5, pp. 16–22. (In Russ.)]
 18. Шляпников С.А., Насер Н.Р., Федорова В.В., Попенко Л.Н. Динамика антибиотикорезистентности актуальных для отделений интенсивной терапии и реанимации возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений и заболеваний // Инфекции в хирургии. 2013. Т. 11, № 1. С. 11–16. [Shlyapnikov S.A., Nasser N.R., Fedorova V.V., Popenko L.N. Analysis of dynamics of an antibiotic resistance of the actual infectious agents in intensive care units. *Infektsii v khirurgii = Infections in Surgery*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 11–16. (In Russ.)]
 19. Эдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Шевченко О.В., Тапальский Д.В., Азизов И.С., Д'соуза Дж.В., Тимохова А.В., Сухорукова М.В., Козырева В.К., Сафронова Е.В., Астахова М.В., Карпов И.А., Шамаева С.Х., Абрамова Н.В., Гординская Н.А., Козлов Р.С., исследовательская группа «МЕТАЛЛ». Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 2. С. 132–152. [Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Shevchenko O.V., Tapalski D.V., Azizov I.S., D'souza J.W., Timokhova A.V., Sukhorukova M.V., Kozyreva V.K., Safronova E.V., Astakhova M.V., Karpov I.A., Shamaeva S.Kh., Abramova N.V., Gordinskaya N.A., Kozlov R.S., "METALL" study group. Prevalence and molecular epidemiology of gram-negative bacteria producing metallo- β -lactamases (MBLs) in Russia, Belarus and Kazakhstan. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 132–152. (In Russ.)]
 20. Biedenbach D., Bouchillon S., Hackel M., Hoban D., Kazmierczak K., Hawser S., Badal R. Dissemination of NDM metallo- β -lactamase genes among clinical isolates of Enterobacteriaceae collected during the smart global surveillance study from 2008 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 2, pp. 826–830. doi: 10.1128/AAC.03938-14
 21. Berditsch M., Jager T., Stempel N., Schwartz T., Overhage J., Ulrich A.S. Synergetic effect of membrane-active peptides Polymyxin B and Gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 9, pp. 5288–5296. doi:10.1128/AAC.00682-15
 22. Bowers D.R., Cao H., Zhou J., Ledesma K.R., Sun D., Lomovskaya O., Tam V.H. Assessment of minocycline and polymyxin B combination against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 2720–2725. doi: 10.1128/AAC.04110-14

23. Bush K., Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, no. 3, pp. 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09
24. Canton R., Akova M., Carmeli Y., Glupczynski C.G., Gniadkowski M., Livermore D.M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G.M., Samuelsen Q., Seifert H., Woodford N., Nordmann P. and the European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. 413–431. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
25. Delgado-Valverde M., Sojo-Dorado J., Pascual A., Rodrigues-Bano J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Ther. Adv. Infect. Dis.*, 2013, vol. 1, no. 2, pp. 49–69. doi: 10.1177/2049936113476284
26. Drawz S., Bonomo R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 160–201. doi: 10.1128/CMR.00037-09
27. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 1, pp. 191–207. doi: 10.1128/CMR.00058-14
28. Eliopoulos G.M., Moellering R.C. «Antimicrobial combinations» in «Antibiotics in Laboratory Medicine». Ed. V. Lorian. 4th Edition. USA, Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1996, pp. 330–396.
29. Falagas M., Vardakas K., Kapaskelis A., Nikolaos R. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 45, no. 5, pp. 455–460. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.12.031
30. Keepers T.R., Gomez M., Biek D., Critchley I., Krause K.M. Effect of in vitro testing parameters on ceftazidime-avibactam minimum inhibitory concentrations. *Int. Scholarly Res. Notices*, vol. 2015, Article ID 489547, 6 p. doi: 10.1155/2015/489547
31. Lambert R.J.W., Johnston M.D., Hanlon G.W., Denyer S.P. Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures — synergy or addition? *J. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 94, no. 4, pp. 747–759. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01908.x
32. Lambert R.J.W., Lambert R. A model for the efficacy of combined inhibitors. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 95, no. 4, pp. 734–743. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02039.x
33. Lim T.P., Cai Y., Hong Y., Chan E.C., Suranthran S., Teo J.Q., Lee W.H., Tan T.Y., Hsu L.Y., Koh T.H., Tan T.T., Kwa A.L. In vitro pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 2515–2524. doi: 10.1128/AAC.03639-14
34. Livermore D.M. Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2012, vol. 39, no. 4, pp. 283–294. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.12.012
35. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
36. Ni W., Shao X., Di X., Cui J., Wang R., Liu Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 45, no. 1, pp. 8–18. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.10.002
37. Paul M., Carmeli Y., Durante-Mangoni E., Mouton J.W., Tacconelli E., Theuretzbacher U., Mussini C., Leibovici L. Combination therapy for carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, no. 9, pp. 2305–2309. doi: 10.1093/jac/dku168
38. Potron A., Poirel L., Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 45, no. 6, pp. 568–585. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001
39. Soren O., Brinch K.S., Patel D., Liu Y., Liu A., Coates A., Hu Y. Antimicrobial peptide Novicidin synergizes with Rifampin, Ceftriaxone and Ceftazidime against antibiotic-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 10, pp. 6233–6240. doi: 10.1128/AAC.01245-15

Авторы:

Афиногенова А.Г., д.б.н., руководитель испытательного лабораторного центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

Ворошилова Т.М., врач-бактериолог, зав. лабораторией бактериологических исследований ФГБУ Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;

Афиногенов Г.Е., д.м.н., профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

Мадай Д.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Afinogenova A.G., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory Testing Centre, St. Petersburg Pasteur Institute; Professor of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Voroshilova T.M., Bacteriologist, Head of Bacterial Laboratory, The Nikiforov All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Afinogenov G.E., PhD, MD (Medicine), Professor of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Maday D.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

СОЗДАНИЕ ИММУНОГЕНА ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА L2E7

И.С. Малахов, Р.И. Аль-Шехадат, И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Рак шейки матки является одним из наиболее распространенных видов новообразований, занимая 7 место в мире среди всех злокачественных опухолей, и вторым по распространенности онкологическим заболеванием у женщин. Необходимым условием развития рака шейки матки является наличие в клетке ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ): ДНК ВПЧ найдено в 99,7% случаев заболевания. Помимо рака шейки матки, ДНК ВПЧ обнаружено в 85% случаев рака прямой кишки, 50% рака вульвы, вагины и пениса, 20% ротоглоточного рака и 10% гортани и рака пищевода. В России количество женщин, вновь заболевших раком шейки матки в 2009 г., составляет 14 000 человек. По сравнению с 1999 г. рост заболеваемости населения составил 19%. Наиболее эффективной мерой в профилактике практически любой инфекции признана вакцинация. В настоящее время в России доступны две вакцины (Церварикс и Гардасил) против вируса папилломы человека, производимые в Бельгии и Нидерландах соответственно. Церварикс представляет собой бивалентную вакцину, состоящую из вирусоподобных частиц, образуемых при самосборке капсидного вирусного белка L1 ВПЧ типа 16 и 18 (онкогенные штаммы вируса, найденные примерно у 70% больных раком шейки матки). В этом препарате белок L1 ВПЧ экспрессируется в рекомбинантном бакуловирусном векторе; вирусоподобные частицы каждого вирусного штамма производятся отдельно и затем объединяются в один препарат. Гардасил аналогичен Цервариксу, однако в качестве продуцентов используются дрожжи *S. cerevisiae*, и в препарат добавлены вирусоподобные частицы вирусов папилломы человека неонкогенных типов 6 и 11. Таким образом Гардасил является квадριвалентной ВПЧ-6/11/16/18 вакциной. Эти вакцины весьма эффективны в предотвращении инфицирования вирусом и не имеют значимых побочных эффектов, однако они обладают и рядом минусов. В первую очередь это высокая стоимость из-за необходимости их экспрессии в эукариотических клетках. Во-вторых, это их штаммоспецифичность, из-за которой вакцины полностью эффективны только против штаммов вируса, представленных в вакцине. В-третьих, это отсутствие терапевтической (лечение уже установившейся инфекции) ценности данных вакцин. В литературе показано, что N-конец вирусного белка L2 способен генерировать нештаммспецифичные нейтрализующие антитела, блокирующие проникновение вируса в клетку. Белок E7 является вирусным онкогеном, отвечающим за неконтролируемую пролиферацию зараженных клеток, что в хронических случаях приводит к опухолевой трансформации. Этот белок по причине своей незаменимости, как для жизненного цикла вируса, так и для поддержания опухолевого фенотипа раковых клеток, является привлекательной целью терапевтической вакцины. Таким образом, недостатков Гардасила и Церварикса была бы лишена вакцина на основе белков L2 и E7 вируса папилломы человека. Создан штамм-продуцент белка на основе клеток *E. coli*, белок очищен в восстановительных денатурирующих условиях металлоаффинной хроматографией и рефолдирован путем последовательного удаления мочевины и меркаптоэтанола.

Ключевые слова: вакцина ВПЧ, папиллома, вирус папилломы человека, белок L2, белок E7, фолдинг.

Адрес для переписки:

Малахов Ипатий Сергеевич
197110, Россия, Санкт-Петербург, Корпусная ул., 28, лит. А,
ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России.
Тел.: 8 950 038-31-62 (моб.).
E-mail: ipaty.malakhov@yahoo.com

Contacts:

Ipatyi S. Malakhov
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Korpusnaya str., 28, lit. A,
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations.
Phone: +7 950 038-31-62 (mobile).
E-mail: ipaty.malakhov@yahoo.com

Библиографическое описание:

Малахов И.С., Аль-Шехадат Р.И., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.
Создание иммуногена против вируса папилломы человека на основе
химерного рекомбинантного белка L2E7 // Инфекция и иммунитет. 2016.
Т. 6, № 4. С. 345–352. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-345-352

Citation:

Malakhov I.S., Al-Shehadat R.I., Duckhovlinov I.V., Simbirtsev A.S. Human
papilloma virus immunogen creation on the base of chimeric recombinant protein
L2E7 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016,
vol. 6, no. 4, pp. 345–352. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-345-352

HUMAN PAPILLOMA VIRUS IMMUNOGEN CREATION ON THE BASE OF CHIMERIC RECOMBINANT PROTEIN L2E7

Malakhov I.S., Al-Shehadat R.I., Duckhovlinov I.V., Simbirtsev A.S.

Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

Abstract. The cervical cancer is one of the most common diseases in world. This malignancy is the seventh highest prevalence oncological disease worldwide and the second highest prevalence oncological disease of women in the world. Meanwhile women need to be infected by human papilloma virus (HPV) is absolutely necessary for its further evolution, HPV DNA was found in 99.97% cases of disease. Except cervical cancer, HPV cause 85% of rectal cancer, 50% of the vulva, vagina and penis cancers, 20% of oropharyngeal cancer and 10% of larynx and esophagus cancers. In 2009, 14 000 women were diagnosed with cervical cancer in Russia. The growth in morbidity was 19% (in comparison with 1999). The most effective recognised measure for almost each infection prophylaxis is a vaccination. Two human papilloma virus vaccines are available in Russia nowadays — Gardasil and Cervarix, produced in Belgium and the Netherlands respectively. Cervarix is a bivalent vaccine based on virus-like particles (VLP) of two types. Recombinant major capsid proteins L1 HPV 16 and HPV 18 express in baculovirus expression system and self-assembled into virus-like particles (about 70 percent of cervical cancers are caused by HPV 16 and HPV 18). VLP of each strain produced in different baculovirus vectors and then combined in single drug. Gardasil is like Cervarix with few exceptions. Producing organisms are fungi *S. cerevisiae* in this case, and this vaccine contains low-risk HPV 6 and HPV 11 VLP. Thus, Gardasil is quadrivalent HPV-6/11/16/18 vaccine. These vaccines are very effective in averting infection of disease and don't have significant side-effects, however they have some disadvantages. Firstly, they have a high price because of necessity of their expression in eukaryotic cells. Secondly, they are strain-specific, so vaccines are completely effective only for virus's strains which are represented in the vaccine. Thirdly, it's the absence of therapeutic (treatment of established infection) value of stated vaccines. According to information from literature, N-terminus of the L2 protein can induce non strain-specific neutralizing antibody that protects organism from papillomavirus challenge. E7 protein is a virus oncogene, its function is unlimited proliferation of infected cells that cause malignization in chronic course of disease. This protein is a very attractive target for therapeutic vaccines because of its necessity both for virus life cycle and sustenance of malignant phenotype in cancer cells. So, in this research the design of immunogen on the base of proteins HPV L2 and E7 is selected, vaccine on the base of which will avoid the disadvantages of Gardasil and Cervarix listed above. The strain-producer of protein on the base of cells *E. coli* was created. The protein was purified in denaturing reducing conditions by metal-affine chromatography and refold by sequential remove of urea and 2-mercaptoethanol.

Key words: HPV vaccine, papilloma, human papillomavirus, L2 protein, E7 protein, folding.

Введение

Вирус папилломы человека (ВПЧ) представляет собой безоболочечный вирус, содержащий двуцепочечную кольцевую ДНК размером примерно 8 тысяч пар оснований. По различным исследованиям, зараженность ВПЧ у женщин по всему миру составляет от 2 до 20% [4], а число женщин, когда-либо в своей жизни имевших контакт с ВПЧ, составляет более 50% [3] от числа сексуально активных женщин. Персистирующая инфекция ВПЧ является наиболее важным этиологическим фактором в развитии рака шейки матки. На сегодняшний день открыто 198 штаммов вируса папилломы человека; общее их число по оценкам достигает четырехсот и более [5]. Примерно полсотни штаммов инфицирует половой тракт, и 13 из них являются онкогенными [18].

Наиболее эффективной мерой в профилактике практически любой инфекции признана вакцинация. Вакцины против вируса папилломы человека можно разделить на профилактические и терапевтические. Профилактические вакцины предотвращают заражение челове-

ка вирусом и основаны на каком-либо белке капсида — L1 и/или L2. К вакцинам на основе белка L1 относятся Гардасил компании Merck и Церварикс компании GlaxoSmithKline. Эти вакцины прошли все фазы клинических испытаний и лицензированы с 2006 г. [36]. Церварикс состоит из вирусоподобных частиц, образуемых при самосборке капсидного белка L1 ВПЧ типа 16 и 18, онкогенных типов вируса, найденных примерно у 70% больных раком шейки матки. L1 экспрессируется с помощью бакуловирусного вектора; вирусоподобные частицы каждого штамма вируса производятся отдельно и затем объединяются в один препарат [29]. Гардасил аналогичен Цервариксу, однако в качестве продуцентов используются 4 штамма дрожжей *S. cerevisiae*. В препарат добавлены вирусоподобные частицы из белка L1 вирусов папилломы человека неонкогенных типов 6 и 11, то есть препарат является квадριвалентной ВПЧ-6/11/16/18 вакциной [16]. Гардасил и Церварикс высокоэффективны в предотвращении заражения человека онкогенными типами 16 и 18 ВПЧ, а также филогенетически наиболее близкими к ним штаммами. Однако,

как показано еще на различных штаммах вируса папилломы быков [23], вакцины на основе вирусоподобных L1 частиц эффективны только против штаммов вируса, из которых был взят ген L1. К примеру, Гардасил и Церварикс частично эффективны в предотвращении заражения ВПЧ-31 и ВПЧ-45, и практически неэффективны в отношении ВПЧ-58 [28]. Помимо этого, из-за использования двух (Гардасил) или даже четырех (Церварикс) эукариотических штаммов для производства вирусоподобных частиц данные вакцины довольно дороги.

Альтернативной целью для профилактической ВПЧ вакцины является минорный белок капсида L2. Кролики, вакцинированные N-концом белка L2 вируса папилломы человека типа 16, приобретали иммунитет против вируса папилломы рта кроликов [15]. Исследования, посвященные локализации консервативных нейтрализующих антител, показали их расположение на N-конце молекулы, приблизительно в районе аминокислотных остатков 13–120. Это соотносится с данными о том, что именно этот район в один из этапов заражения находится на поверхности вируса. К примеру, антитела против N-концевых 88 аминокислотных остатков белка L2 вируса папилломы быков 1 активны против других штаммов вируса, в то время как другие домены этого белка не вызывают образования подобных антител [31]. Однако проблемой использования белка L2 в качестве вакцины является его малая иммуногенность. У невакцинированных зараженных животных уровень антител к L2 ниже уровня детекции [6]. Уровень антител при вакцинации рекомбинантным L2 несравненно ниже вызванного вакцинацией L1-вирусоподобными частицами. Таким образом, при создании вакцины на основе L2 необходимо повысить его иммуногенность. Одним из методов решения этой задачи является конкатомеризация N-концов L2 различных штаммов ВПЧ [20, 21, 22, 24]. Повышение иммуногенности в этом случае объясняется наличием в одном белке множества одинаковых эпитопов, что вызывает интернализацию В-клеточных рецепторов на поверхности В-клетки и индукцию ее пролиферации [1]. Использование данного метода позволяет повысить отношение нештаммспецифичных нейтрализующих антител к штаммоспецифичным, так как происходит амплификация идентичных консервативных эпитопов в пределах одной молекулы (в то время как количество идентичных штаммоспецифичных эпитопов остается прежним). Данный подход безопасен, так как не использует потенциально опасных компонентов, и дешев — конкатомеры экспрессируются в *E. coli*.

Что касается лицензированных терапевтических вакцин от ВПЧ, то в настоящее время их

не существует. В виду того, что в малигнизированных клетках из всех вирусных белков экспрессируются только вирусные онкогены E6 и E7 [13], именно они и являются наиболее привлекательной целью иммунотерапии. На основе E7 в настоящее время создается множество терапевтических вакцин [10, 11, 26, 40, 41]

Целью работы было создание белка-иммуногена против онкогенных вирусов папилломы человека, потенциально объединяющего в себе терапевтические и профилактические свойства. В результате был смоделирован химерный белок L2E7, содержащий N-концевые эпитопы вирусных белков L2 (наиболее распространенных у больных раком шейки матки в России [34]) штаммов ВПЧ-16, ВПЧ-18 и ВПЧ-45), а также две полноразмерные копии белков E7 вирусов папилломы человека типа 16 и 18. Домены белка соединены гибкими неиммуногенными пептидными мостиками.

Материалы и методы

Синтез и клонирование гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок L2E7. Синтез последовательностей гена *l2e7* осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов [42]. В общей сложности для синтеза гибридного гена *l2e7* длиной 1550 п.н. использовали 42 олигонуклеотида. Полученный ген клонировали в векторе pGEM-T Easy, с последующим клонированием в экспрессионной плазмиде pET28a(+) по рестрикционным сайтам NdeI и XhoI. Для амплификации вектора pET28a(+)-*l2e7* трансформировали им клетки *E. coli* штамма DH10B/R (GibcoBRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM 15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)769 galUgalKλ-rpsLnpG методом электропорации. Клетки *E. coli* проверяли на наличие плазмиды на селективной среде, содержащей LB-агар и 100 мкг/мл канамицина. Полученные колонии *E. coli* использовали для амплификации плазмидной ДНК, содержащей гибридный ген. Очищенную плазмидную ДНК проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

В ходе работы был отобран клон, содержащий фрагмент ДНК требуемого размера в составе плазмиды. Из полученного штамма была выделена плаزمида для создания штамма *E. coli*, используемого для дальнейшей экспрессии целевого гена.

Создание штамма-продуцента, кодирующего гибридный рекомбинантный белок L2E7. Для экспрессии гена, кодирующего L2E7, использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США), с генотипом F-ompThsdSB (rB-mB-) galdcM rne131 (DE3), содержащие в ге-

номе λ De3 лизоген и мутацию *rne131*. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее стабильности. *lon*- и *ompT*-мутации по генам протеаз уменьшают протеолитическую деградацию белков. Трансформацию компетентных клеток плазмидой *pET28a(+)-l2e7* осуществляли методом электропорации.

Индукция экспрессии гибридного гена l2e7. Осуществляли подбор оптимального протокола индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок L2E7. Для этого производили индукцию экспрессии гибридного гена двумя способами — с помощью изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 1 мМ и 0,2% лактозы по Штудиеру [37]. Индукцию экспрессии гена *l2e7* 1 мМ ИПТГ осуществляли следующим образом: инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0,6–0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантного гена с помощью добавления ИПТГ к культуре до конечной концентрации 1 мМ. Оставляли на 8 часов для определения оптимального уровня экспрессии белка, после чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Индукцию экспрессии гена *l2e7* 0,2% лактозой (по Штудиеру) осуществляли следующим образом: в среду RYP-5052, содержащую 1% пептон (Gibco, США), 0,5% дрожжевой экстракт (Gibco, США), 50 мМ Na_2HPO_4 , 50 мМ K_2HPO_4 , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0,5% глицерол, 0,05% глюкозу и 0,2% лактозу, канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После ферментирования культуру при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение 16–20 ч до отсутствия существенного изменения ОП600 за 1 ч. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ. Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза аликвот клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза по Леммли [27].

Очистка гибридного рекомбинантного белка L2E7. Очистку гибридного рекомбинантного белка L2E7 проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [19]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка. Индуцированные клетки-продуценты лизировали с помощью 28 циклов соникации по 15 с с перерывом в 45 с на льду. Тельца включения очищались центрифугированием лизата клеток при 20 000g в течение 20 мин. Затем проводили разрушение телец включения путем их инкубации с лизирующим буфером (20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6 М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий, 20 мМ имидазол, 15 мМ β -меркаптоэтанол) в течение часа. Связывание с колонкой происходило в течение ночи. Далее колонку инкубировали 10 мин при осторожном покачивании (100 об./мин) и комнатной температуре с двумя объемами (относительно объема сорбента) буфера для нанесения (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 15 мМ β -меркаптоэтанол, pH 7,8). После этого процедуру последовательно повторили с буфером для промывки, pH 6,0 (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 15 мМ β -меркаптоэтанол, pH 6,0) и буфером для промывки, pH 5,0. Элюировали белок инкубацией сорбента в течение 60 мин при осторожном покачивании (100 об./мин) и комнатной температуре с двумя объемами (относительно объема сорбента) буфера для элюции (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 15 мМ β -меркаптоэтанол, pH 3,8). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли анализом с использованием бицинхониновой кислоты. Далее материал анализировали диск-электрофорезом по Леммли.

Рефолдинг гибридного рекомбинантного белка L2E7. После очистки белка L2E7 на Ni-НТА сорбенте белок находился в денатурированном состоянии в буфере для элюции (8 М мочевины, 15 мМ меркаптоэтанол, 20 мМ натрий фосфатный буфер, 500 мМ хлористый натрий, pH 3,8; рис. 1, дорожка 3). При очистке белка в невосстанавливающих условиях образуются высокомолекулярные агрегаты (рис. 1, дорожка 1).

Для рефолдинга белок диализом перенесли в буфер для рефолдинга-1 (2 М мочевины, 0,4 М L-аргинин, 15 мМ меркаптоэтанол, 100 мМ PBS, 125 мМ хлористый натрий, pH 7,5), после этого центрифугированием в течение 20 мин, 20 000g удалили несфолдированную часть белка, образовавшую агрегаты. После этого белок диализом перенесли в буфер для рефолдинга-2 (1 М мочевины, 100 мМ PBS, pH 7,5); после вто-

рого диализа центрифугированием в течение 20 мин, 20 000g удалили несфолдированную часть белка, образовавшую агрегаты.

Указанный протокол выбрали из других испытанных нами методов (таких как очистка и рефолдинг без применения 2-меркаптоэтанола, замена меркаптоэтанола парой окисленный/восстановленный глутатион, понижение концентрации мочевины и удаление меркаптоэтанола за один сеанс диализа, рефолдинг без L-аргинина, замена L-аргинина сахарозой, использование сахарозы совместно с L-аргинином, рефолдинг при различных значениях pH) по наибольшему выходу сфолдированного белка.

Результаты

Смоделирован гибридный белок — L2E7, содержащий N-концы белков L2 вирусов папилломы человека типа 16, 18 и 45, а также 2 полно-размерные копии белков E7 вирусов папилломы человека типа 16 и 18. После встраивания гена L2E7 в вектор pet28a (+) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI белковый продукт получил полигистидиновую метку. Анализ полученной последовательности в программе UniPro UGENE v.1.16.2 показал, что химерный белок имеет размер 480 аминокислот, молекулярную массу 50,8 kDa и pI 6,18.

Создан штамм-продуцент на основе клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3), трансформированных вектором pet28a (+) *l2e7*. Изучили экспрессию гибридного гена *l2e7* при использовании в качестве индуктора 1 mM ИПТГ и 0,2% лактозой по Штудиеру. Подобрали оптимальный прокол индукции экспрессии L2E7 — метод автоиндукции, который является оптимальным по выходу белка и затратам на его осуществление. Получен высокоочищенный гибридный рекомбинантный белок L2E7 металлоаффинной хроматографией с Ni-НТУ сефарозой. Разработан протокол рефолдинга белка L2E7.

Обсуждение

L2E7 содержит в себе N-концевые части белка L2 трех наиболее высокоонкогенных штаммов вируса, распространенных в России. В ходе естественно протекающей инфекции слабый иммунитет развивается только против белка L1 [8, 31]. В то же время белок L2 большую часть времени скрыт внутри капсида, при этом его количество в самом капсиде составляет максимум 72 копии против 360 копий молекулы L1. Вследствие низкой иммуногенности белка L2 в естественно протекающей инфекции антител против него не возникает вовсе [6]. Однако N-конец белка L2 содержит консервативные эпитопы, к которым возможно образование

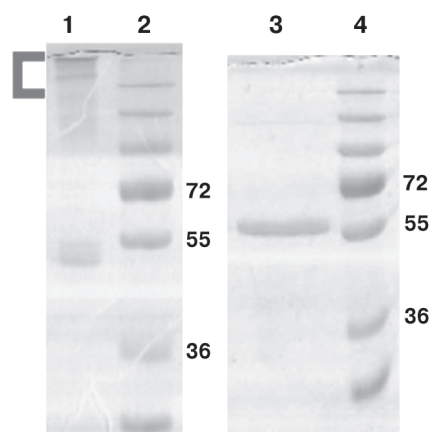


Рисунок 1. Электрофореграммы, полученные при очистке белка L2E7 металлоаффинной хроматографией. Метод SDS-электрофореза по Лэмбли в невосстанавливающих условиях

При пробоподготовке в пробы не был добавлен восстанавливающий агент.

1 — L2E7 после очистки на Ni-НТУ сорбенте в невосстанавливающих условиях (белок в 8 М мочевины и 20 mM натрий фосфатном буфере). Скобкой отмечены предположительно высокомолекулярные агрегаты L2E7. 2, 4 — маркеры молекулярного веса Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

3 — L2E7 после очистки на Ni-НТУ сорбенте в восстанавливающих условиях (белок в 8 М мочевины, 20 mM натрий фосфатном буфере, 15 mM β-меркаптоэтаноле).

нейтрализующих антител [14, 20, 33]. В литературе описаны успешные попытки повышения иммуногенности N-конца молекулы L2 путем слияния в одном белке N-концов белка L2 сразу нескольких штаммов [20, 21, 22, 24].

Вакцины на основе капсидных белков вируса папилломы человека могут предотвратить заражение вирусом, но не могут элиминировать уже установившуюся инфекцию. Для терапевтической активности кандидатного иммуногена в него были введены копии белка E7 двух наиболее высокоонкогенных штаммов вируса, распространенных в России. Вирусный протонкоген E7 индуцирует трансформацию клеток хозяина взаимодействием со множеством клеточных белков-мишеней, основным из которых является pRb. Инактивация этого белка является главной функцией E7; эффективность трансформации клетки напрямую коррелирует с аффинностью E7 к pRb [17]. К разрабатываемым вакцинам, имеющим в своем составе E7, входят Пентарикс [41], TA-CIN [10], SGN-00101 [40] и другие.

Для облегчения рефолдинга независимые домены в рекомбинантном белке отделены друг от друга гибкими неиммуногенными пептидными мостиками. Высокая вероятность правильного рефолдинга L2E7 подтверждается

моделированием третичной структуры иммуногена, выполненным на основе первичной последовательности белка алгоритмом I-Tasser [35, 43, 44] (рис. 2, III обложка).

При очистке и рефолдинге химерного белка L2E7 было обнаружено, что уже в элюирующем буфере в денатурированном белке начинается образование дисульфидных связей. Для предотвращения окисления белка в элюирующие буферы был добавлен 15 мМ β-меркаптоэтанол. Концентрация меркаптоэтанола выбиралась исходя из того, что максимально допустимая его концентрация при работе с Ni-NTA сорбентом составляет 20 мМ [32].

Проблематичное рефолдирование кандидатного иммуногена L2E7 по всей видимости связано с образованием некорректных дисульфидных связей между остатками цистеина в N-концевых фрагментах L2 и цинк-связывающих сайтов E7. Всего в одной молекуле L2E7 20 остатков цистеина, которые потенциально могут образовывать дисульфидные связи — по 2 остатка цистеина на каждый фрагмент L2 и по 7 остатков в каждой копии E7. В естественных условиях E7 образует дисульфидные связи [30], так как, помимо того, что белок находится в цитоплазме клетки (где преобладают восстанавливающие условия), остатки цистеина в правильно свернутой молекуле пространственно разобщены друг от друга. По одной дисульфидной связи в естественных условиях должно образовываться в каждом фрагменте N-конца L2 [7]. Некорректное взаимодействие между остатками цистеина фрагментов L2 и остатками цистеина E7 предполагается, исходя из-за анализа литературы. Рекомбинантный белок, состоящий из пяти слитых N-концов белков L2 различных штаммов вируса, успешно ренатурировался одноступенчатым диализом против PBS [20], то же самое относится и к Пентариксу, молекуле, состоящей из 5 слитых вместе копий E7 различных штаммов вируса папилломы человека [41]. Однако в случае слитых вместе белков L2 и E7 (например, рекомбинантного белка L2E6E7 [12], вакцины Та-CIN, состоящей из слитых L2, E6 и E7 ВПЧ-16 [25], а также рекомбинантного белка, состоящего из L2 и E7 ВПЧ-6 [38]), в работах упоминается очистка белка в восстанавливающих условиях. Это, очевидно, говорит о проблеме корректного образования дисульфидных связей при рефолдинге данных бел-

ков. При этом в упомянутых статьях экспрессия белков, состоящих из фрагментов L2 и/или E7, в *E. coli*, приводит к образованию телец включения, что говорит о неспособности данных белков правильно фолдироваться в условиях цитоплазмы *E. coli*.

Метод рефолдирования белка, потенциально образующего дисульфидные связи, был предложен Анфинсеном в 1961 г. [2]. В его эксперименте по рефолдированию денатурированной в 8 М мочевины и восстановительных условиях РНКазы А 90% активной формы данного фермента было получено при снижении концентрации мочевины с дальнейшим удалением меркаптоэтанола. При одновременном снижении концентраций мочевины и β-меркаптоэтанола, а также при удалении сначала β-меркаптоэтанола, а затем мочевины, выход активной РНКазы А колебался в районе 1%. Предположительно, при снижении концентрации мочевины происходит сворачивание восстановленного белка с пространственным сближением тех остатков цистеина, которые в нативной форме образуют дисульфидную связь. При последующем удалении восстанавливающего агента происходит образование корректных дисульфидных связей. Для рефолдинга молекулы химерного рекомбинантного белка L2E7 концентрация мочевины снижалась с 8 М до 2 М с сохранением концентрации меркаптоэтанола. Именно при 2 М концентрации мочевины начинается связывание мочевины с молекулой белка [39] и образование денатурированных молекул белка [9]. Видимо при таком содержании мочевины в растворе белок находится в пограничном состоянии между «расплавленной глобулой» и полностью фолдированным белком. Исходя из этого, для окончательного фолдирования L2E7, образования дисульфидных связей, а также нивелирования возможного влияния L-аргинина и повышенной концентрации мочевины на процесс иммунизации (планируемый в дальнейшем), пробу белка диализовали еще раз для удалением β-меркаптоэтанола и понижения концентрации мочевины до 1 М. Таким образом, растворимость белка в фосфатном буфере без добавления меркаптоэтанола, а также отсутствие высокомолекулярных полос при электрофорезе в невосстанавливающих условиях, позволяют предположить корректное сворачивание белка L2E7 при выбранной схеме рефолдинга.

Список литературы/References

1. Ярилин А.А. Иммунология. ГЭОТАР Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunologiya [Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 752 p.]
2. Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1961, vol. 47, no. 9, p. 1309. doi: 10.1073/pnas.47.9.1309
3. Baseman J.G., Koutsky L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J. Clin. Virol.*, 2005, vol. 32, pp. 16–24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008

4. Bosch F.X., De Sanjosé S. Human papillomavirus and cervical cancer — burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, vol. 2003, no. 31, pp. 3–13. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003479
5. Bzhalava D., Eklund C., Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 2015, vol. 476, pp. 341–344. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.028
6. Campo M.S., Grindlay G.J., O'Neil B.W., Chandrachud L.M., McGarvie G.M., Jarrett W.F. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J. Gen. Virol.*, 1993, vol. 74, pp. 945–953. doi: 10.1099/0022-1317-74-6-945
7. Campos S.K., Ozbun M.A. Two highly conserved cysteine residues in HPV16 L2 form an intramolecular disulfide bond and are critical for infectivity in human keratinocytes. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 2, e4463. doi: 10.1371/journal.pone.0004463
8. Christensen N.D., Cladel N.M., Reed C.A., Budgeon L.R., Embers M.E., Skulsky D.M., McClements W.L., Ludmerer S.W., Jansen K.U. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology*, 2001, vol. 291, no. 2, pp. 324–334. doi: 10.1006/viro.2001.1220
9. Creighton T.E. Kinetic study of protein unfolding and refolding using urea gradient electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1980, vol. 137, no. 1, pp. 61–80. doi: 10.1016/0022-2836(80)90157-6
10. Daayana S., Elkord E., Winters U., Pawlita M., Roden R., Stern P.L., Kitchener H.C. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*, 2010, vol. 102, no. 7, pp. 1129–1136. doi: 10.1038/sj.bjc.6605611
11. Demurtas O.C., Massa S., Ferrante P., Venuti A., Franconi R., Giuliano G.A. Chlamydomonas-derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 4, pp. E61473. doi: 10.1371/journal.pone.0061473
12. Fang-Cheng Z., Gang C., Jie W., Su-Feng J., Yun-Shui J., Men G., Jian-Buo L., Li Z., Zian M., Houwen T. Evaluation of pre-clinical efficacy to HPV16 L2E6E7 vaccine and HPV16 E6E7 adenovirus-5 vector vaccine with different dosages and prime-booster regimens in mouse model. *J. Vaccines Vaccin.*, 2013, vol. 4, pp. 1–4. doi: 10.4172/2157-7560.1000189
13. Frazer I.H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 46–55. doi: 10.1038/nri1260
14. Gambhira R., Karanam B., Jagu S., Roberts J.N., Buck C.B., Bossis I., Alphs H., Culp T., Neil D., Christensen N.D., Roden R.B. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 24, pp. 13927–13931. doi: 10.1128/JVI.00936-07
15. Gambhira R., Jagu S., Karanam B., Gravitt P.E., Culp T.D., Christensen N.D., Roden R.B. Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 21, pp. 11585–11592. doi: 10.1128/JVI.01577-07
16. Govan V.A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil®). *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2008, vol. 4, no. 1, p. 65. doi: 10.2147/TCRM.S856
17. Heck D.V., Yee C.L., Howley P.M., Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, no. 10, pp. 4442–4446. doi: 10.1073/pnas.89.10.4442
18. International Agency for Research on Cancer, IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC*, 2012, vol. 100B. doi: 10.1016/s0378-8741(03)00216-2
19. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Catalog nos. K950-01, K951-01, K952-01, K953-01, K954-01, R901-01, R901-10, R901-15. Version C. 25-0496, 2006, 32 p.
20. Jagu S., Karanam B., Gambhira R., Chivukula S.V., Chaganti R.J., Lowy D.R., Schiller J.T., Roden R.B. Concatenated multi-type L2 fusion proteins as candidate prophylactic panhuman papillomavirus vaccines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, vol. 101, no. 11, pp. 782–792. doi: 10.1093/jnci/djp106
21. Jagu S., Kwak K., Karanam B., Huh W. K., Damotharan V., Chivukula S.V., Roden R.B. Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 1, e55538. doi: 10.1371/journal.pone.0055538
22. Jagu S., Kwak K., Garcea R.L., Roden R.B. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 28, pp. 4478–4486. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.039
23. Jarrett W.F., O'Neil B.W., Gaukroger J.M., Smith K.T., Laird H.M., Campo M.S. Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunology after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. *Vet. Rec.*, 1990, vol. 126, no. 19, pp. 473–475. doi: 10.1136/vr.126.19.473
24. Kalnin K., Tibbitts T., Yan Y., Stegalkina S., Shen L., Costa V., Sabharwal R., Anderson S.F., Day P.M., Christensen N., Schiller J.T., Jagu S., Roden R.B., Almond J., Kleanthous H. Low doses of flagellin-L2 multimer vaccines protect against challenge with diverse papillomavirus genotypes. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 28, pp. 3540–3547. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.032
25. Karanam B., Gambhira R., Peng S., Jagu S., Kim D.J., Ketner G.W., Stern P.L., Adams R.J., Roden R.B. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 7, pp. 1040–1049. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.099
26. Kawana K., Adachi K., Kojima S., Taguchi A., Tomio K., Yamashita A., Nishida H., Nagasaka K., Arimoto T., Yokoyama T., Wada-Hiraike O., Oda K., Sewaki T., Osuga Y., Fujii, T. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 47, pp. 6233–6239. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.020
27. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. doi: 10.1016/0022-2836(73)90198-8
28. Malagón T., Drolet M., Boily M.C., Franco E. L., Jit M., Brisson J., Brisson M. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 10, pp. 781–789. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70187-1
29. Monie A., Hung C.F., Roden R., Wu T.C. Cervarix™: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics.*, 2008, vol. 2, no. 1, pp. 107. doi: 10.2147/BTT.S1877

30. Ohlenschläger O., Seiboth T., Zengerling H., Briese L., Marchanka A., Ramachandran R., Baum M., Korbas M., Meyer-Klaucke W., Dürst M., Görlach M. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene*, 2006, vol. 25, no. 44, pp. 5953–5959. doi: 10.1038/sj.onc.1209584
31. Pastrana D.V., Buck C.B., Pang Y.S., Thompson C.D., Castle P.E., Fitzgerald P.C., Kjaer S.K., Lowy D.R., Schiller J.T. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*, 2004, vol. 321, no. 2, pp. 205–216. doi: 10.1016/j.virol.2003.12.027
32. QIAGEN. Compatibility of reagents with Ni-NTA. *QIAGEN*, 2006.
33. Roden R.B., Yutzy W.H., Fallon R., Inglis S., Lowy D.R., Schiller J.T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*, 2000, vol. 270, no. 2, pp. 254–257. doi: 10.1006/viro.2000.0272
34. Rogovskaya S.I., Shabalova I.P., Mikheeva I.V., Minkina G.N., Podzolkova N.M., Shipulina O.Y., Sultanov S.N., Kosenko I.A., Brotons M., Buttman N., Dartell M., Arbyn M., Syrjänen S., Poljak M. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western Countries of the former Soviet Union, Caucasus Region and Central Asia. *Vaccine*, 2013, vol. 31, pp. H46–H58. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.043
35. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 725–738. doi: 10.1038/nprot.2010.5
36. Schiller J.T., Castellsagué X., Villa L.L., Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*, 2008, vol. 26, pp. K53–K61. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.002
37. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016
38. Thompson H.S.G., Davies M.L., Watts M.J., Mann A.E., Holding F.P., O'Neill T., Beech J.T., Thompson S.J., Leesman G.D., Ulrich J.T. Enhanced immunogenicity of a recombinant genital warts vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A. *Vaccine*, 1998, vol. 16, no. 20, pp. 1993–1999. doi: 10.1016/S0264-410X(98)00088-7
39. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, 2003, vol. 28, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00641-1
40. Van Doorslaer K., Reimers L.L., Studentsov Y.Y., Einstein M.H., Burk R.D. Serological response to an HPV16 E7 based therapeutic vaccine in women with high-grade cervical dysplasia. *Gynecol. Oncol.*, 2010, vol. 116, no. 2, pp. 208–212. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.05.044
41. Wick D.A., Webb J.R. A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 44, pp. 7857–7866. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.090
42. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Li X., Fan H.Q., Cheng Z.M., Li Y. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, no. 12, pp. e98–e98. doi: 10.1093/nar/gnh094
43. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 7–8. doi: 10.1038/nmeth.3213
44. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 2008, vol. 9, no. 1, p. 40. doi: 10.1186/1471-2105-9-40

Авторы:

Малахов И.С., магистр биологии, инженер 1 категории лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Аль-Шехадат Р.И., к.б.н., зам. зав. лабораторией генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Духовлинов И.В., к.б.н., зав. лабораторией генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Симбирцев А.С., член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор, директор ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Malakhov I.S., Master (Biology), Engineer, Genetic Engineering Vaccine Laboratory, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;
Al-Shehadat R.I., PhD (Biology), Deputy Head of the Genetic Engineering Vaccine Laboratory, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;
Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Head of the Genetic Engineering Vaccine Laboratory, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;
Simbirtsev A.S., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Biology), Professor, Director of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.08.2016
 Отправлена на доработку 05.10.2016
 Принята к печати 20.10.2016

Received 31.08.2016
 Revision received 05.10.2016
 Accepted 20.10.2016

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КОРИ В ОТДЕЛЬНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ В РАМКАХ ГЛОБАЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ. СООБЩЕНИЕ 1

А.Ю. Попова¹, М.А. Бичурина², И.Н. Лаврентьева², Н.В. Железнова²,
А.Ю. Антипова², С.А. Щербакова³, М.Й. Буаро⁴, Арег А. Тотолян²

¹ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³ ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,
г. Саратов, Россия

⁴ НИИ прикладной биологии Гвинеи, г. Кинди, Гвинейская Республика

Резюме. Корь остается одной из основных причин детской смертности в развивающихся странах и периодически приводит к возникновению крупных вспышек в разных странах. Эта проблема стала особенно актуальна после принятия ВОЗ стратегического плана по борьбе с корью. Согласно плану поставлена цель снижения кори в глобальном масштабе. В 2010–2011 гг. крупные вспышки кори регистрировались на Африканском континенте: в Демократической Республике Конго, на юге Африки, в Нигерии и в ряде других африканских стран. В Гвинейской Республике вакцинация против кори проводится однократно детям в возрасте 9 месяцев. В 2014–2015 гг. отмечен рост заболеваемости корью. *Материалы и методы.* В ИФА исследованы 22 сыворотки крови здоровых взрослых гвинейцев в возрасте от 24 до 71 года и 136 сывороток крови, полученных от детей и взрослых — пациентов госпиталя г. Кинди (Гвинейская Республика). Клинические образцы были получены в 2015–2016 гг. Использованы тест-системы производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Германия): «Anti-Measles Virus ELISA (IgM)», «Anti-Measles Virus ELISA (IgG)»; «Avidity: Anti-Measles Virus ELISA (IgG)», а также ИФА тест-система «Вектор-Бест IgM-корь» (Россия). *Результаты и обсуждение.* Только у одного из 22 обследованных не были выявлены IgG-антитела к вирусу кори. Количественное определение титров IgG-антител, а также их авидности у остальных обследованных (21 человек) свидетельствуют о перенесенном в недавнем или отдаленном прошлом заболевании корью. При исследовании 116 сывороток крови пациентов госпиталя г. Кинди на IgM-корь-антитела, ретроспективно выявлен случай кори у ребенка 2,5 лет. При исследовании 130 сывороток крови на наличие IgG-антител к вирусу кори, выявлены 12,3% серонегативных к кори лиц. Все обследованные в возрасте 23 года и старше были серопозитивны к вирусу кори, причем 60% из них имели высокие титры антител. Антитела к вирусу кори отсутствовали или определялись в низких титрах у 76,2% лиц в возрасте до 22 лет, что может свидетельствовать о нарушениях плановой вакцинации

Адрес для переписки:

Лаврентьева Ирина Николаевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-11 (служебн.); 8 (921) 341-05-01 (моб.).
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Contacts:

Irina N. Lavrentieva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-11 (office); +7 (921) 341-05-01 (mobile).
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Библиографическое описание:

Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 1 // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 353–358. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358

Citation:

Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian Areg A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the Republic of Guinea within the framework of global measles elimination program. Report 1 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 353–358. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358

детей из-за вспышки лихорадки Эбола. Для снижения риска возникновения крупных вспышек кори в районах, свободных от передачи вируса Эбола, ВОЗ рекомендует проводить кампании массовой противокоревой вакцинации.

Ключевые слова: корь, Гвинейская Республика, заболеваемость, уровень IgG-антител, программа элиминации, лихорадка Эбола.

MEASLES VIRUS IMMUNITY LEVEL STUDY IN PARTICULAR POPULATION GROUPS OF THE REPUBLIC OF GUINEA WITHIN THE FRAMEWORK OF GLOBAL MEASLES ELIMINATION PROGRAM. REPORT 1

Popova A.Yu.^a, Bichurina M.A.^b, Lavrentyeva I.N.^b, Zheleznova N.V.^b, Antipova A.Yu.^b, Shcherbakova S.A.^c, Boiro M.Y.^d, Totolian Areg A.^b

^a Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Moscow, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^c Russian Scientific and Research Antiplague Institute "Mikrob", Saratov, Russian Federation

^d Institute of Applied Biology in Guinea, Kindia, Republic of Guinea

Abstract. Measles remains one of the main reasons for child mortality in developing countries and periodically leads to the emergence of large outbreaks in different countries. This problem became especially urgent after WHO accepted the strategic plan to fight against measles. The plan has set the goal to decrease measles on a global scale. In 2010–2011 the large outbreaks of measles were registered on the African continent: in the Democratic Republic of Congo in the south of Africa, in Nigeria and in some other African countries. In the Republic of Guinea vaccination against measles is carried out singly to children aged 9 months. In 2014–2015 the increase of measles incidence was noted. *Materials and methods.* Using ELISA 22 blood serum samples of healthy adult Guineans aged 24–71 and 136 blood serum samples received from children and adults — the patients of hospital in the town of Kindi (Republic of Guinea) have been examined. The clinical samples were received in 2015–2016. The following test systems were used: the test systems produced by Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Germany): «Anti-Measles Virus ELISA (IGM)», «Anti-Measles Virus ELISA (IgG)»; «Avidity: Anti-Measles Virus ELISA (IgG)», and also ELISA Vector-Best IgM-measles test system (Russia). *Results and discussion.* Only one out of 22 examined healthy individuals hasn't revealed IgG-antibodies to measles virus. The quantitative titre test of IgG-antibodies, and also their avidity among other 21 individuals testify experiencing measles in the recent or remote past. Having examined 116 blood serum samples of hospital patients in Kindi for IgM-measles-antibodies, the measles case with a 2.5-year-old child has been retrospectively revealed. Having examined 130 blood serum samples for IgG-antibodies to measles virus, 12.3% of seronegative to measles individuals have been revealed. All examined individuals aged 23 and older were seropositive to measles virus, and 60% of them had high antibody titres. The antibodies to measles virus were absent or were defined in low titres among 76.2% of people under 22, which can demonstrate violations of planned child vaccination due to the Ebola outbreak. In order to decrease the risk of emergence of large measles outbreaks in the areas, free from Ebola virus transmission, WHO recommends to conduct mass anti-measles vaccination campaigns.

Key words: measles, Republic of Guinea, disease incidence, IgG-antibodies titres, elimination programme, Ebola fever.

Введение

Несмотря на наличие доступных высокоиммуногенных вакцин, корь остается одной из основных причин детской смертности в развивающихся странах и периодически приводит к возникновению крупных вспышек в индустриально развитых странах [10]. Эта проблема приобрела особую актуальность после принятия ВОЗ стратегического плана по борьбе с корью, в соответствии с которым поставлена цель снижения кори в глобальном масштабе и элиминации инфекции в отдельных регионах мира, в том числе в Европейском регионе к 2010 г. [6].

В 2000–2010 гг. число зарегистрированных случаев кори в мире сократилось на 65%, а рас-

четное число смертей — на 70%. Эти показатели — результат постоянного повышения глобального уровня охвата детей первичной вакцинацией против кори, который за этот период увеличился на 13%. Кроме того, постоянно растет количество привитых двумя дозами вакцины. В целом, за период с 2000 по 2010 гг. против кори привито около 1 млрд детей.

Несмотря на успехи в борьбе с корью, в мире по-прежнему возникают эпидемические вспышки этого заболевания [2, 8]. В 2010–2011 гг. крупные вспышки кори регистрировались на Африканском континенте: в Демократической Республике Конго (более 121 тыс. случаев), на юге Африки (176 тыс. случаев), в Нигерии (около 30 тыс. случаев) и в ряде других африканских стран [7].

В связи с подъемом заболеваемости, в мире был принят новый стратегический план, который предусматривал другие сроки элиминации кори в отдельных регионах ВОЗ. В Американском регионе показатель заболеваемости корью менее 1 случая на миллион населения был достигнут к 2010 г. В это время регистрировали, в основном, импортированные случаи заболевания [7, 9]. Элиминация кори в Западно-Тихоокеанском регионе ВОЗ предусматривалась к 2012 г.; в Европейском и Восточно-Средиземноморском регионах — к 2015 г.; в Африканском — к 2020 г. В регионе Юго-Восточной Азии ставилась задача снижения смертности от кори к 2015 г. Однако сроки реализации глобальной программы элиминации кори и краснухи вновь перенесены.

В Гвинейской Республике проживает более 12 млн человек, из них детей в возрасте до 5 лет около 2 млн человек, детей до 15 лет около 5 млн человек. Вакцинация против кори проводится однократно детям в возрасте девяти месяцев. По данным ВОЗ, в период с 1980 по 2001 гг. заболеваемость корью была высокой, в отдельные годы регистрировали до 15–18 тыс. больных в год (рис. 1).

В 2002 г. число случаев кори снизилось в 3,4 раза по сравнению с 2001 г. и в 8,4 раза по сравнению с 1999 г. В последующие годы регистрировали единичные случаи кори. Однако в 2014–2015 гг. отмечен рост заболеваемости корью.

По мнению экспертов ВОЗ [10], подъем заболеваемости корью может быть связан со снижением уровня охвата вакцинацией против

этой инфекции в Гвинейской Республике из-за вспышки лихорадки Эбола.

Цель исследования — определение уровня иммунитета к кори в разных возрастных группах населения Гвинейской Республики.

Материалы и методы

Исследованы 22 сыворотки крови здоровых взрослых гвинейцев в возрасте от 24 до 71 года и 136 сывороток крови, полученных от детей и взрослых, находившихся на стационарном лечении в госпитале г. Кинди (Гвинейская Республика). Клинические образцы были получены в 2015–2016 гг.

Сыворотки крови исследовали в ИФА на наличие IgM-антител к вирусу кори с тест-системой «Anti-Measles Virus ELISA (IgM)»; на наличие IgG-антител к вирусу кори с тест-системой «Anti-Measles Virus ELISA (IgG)»; avidность IgG-антител определяли с тест-системой «Avidity: Anti-Measles Virus ELISA (IgG)». Перечисленные тест-системы производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Германия) использовали в соответствии с инструкцией по применению. Часть сывороток исследована на наличие IgM-антител к вирусу кори в ИФА с тест-системой «Вектор-Бест IgM-корь» (Россия).

Статистическая обработка данных проводилась методом параметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента для определения значимости различий между явлениями. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

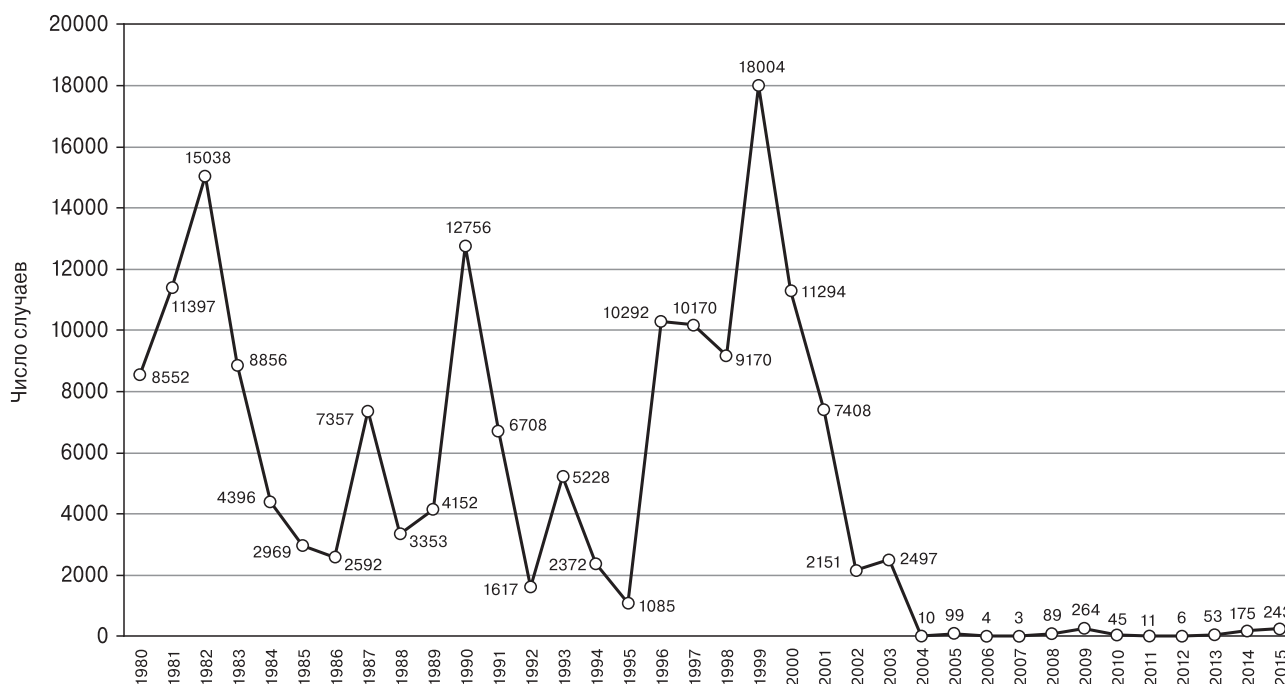


Рисунок 1. Число случаев кори в Гвинейской Республике в период 1980–2015 гг. (WHO/IVB, 2016)

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ IgG-АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КОРИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ

| № | Возраст, лет | IgG корь | | |
|----|--------------|---------------|--------------|-----------------|
| | | Качественная* | Титр, IU/L** | Авидность, %*** |
| 1 | 47 | + | 2794 | 81,7 |
| 2 | 24 | + | 1632 | 82,6 |
| 3 | 28 | + | 941 | 81,6 |
| 4 | 27 | + | 382 | 61,6 |
| 5 | 26 | + | 544 | 65,8 |
| 6 | 30 | - | 176 | - |
| 7 | 39 | + | 3500 | 88,5 |
| 8 | 35 | + | 500 | 67,7 |
| 9 | 39 | + | 1412 | 71,7 |
| 10 | 58 | + | 1250 | 81,9 |
| 11 | 29 | + | 2000 | 85,8 |
| 12 | 37 | + | 4000 | 91,9 |
| 13 | 34 | + | больше 5000 | 100,0 |
| 14 | 33 | + | больше 5000 | 94,4 |
| 15 | 32 | + | больше 5000 | 99,6 |
| 16 | 31 | + | больше 5000 | 88,4 |
| 17 | 37 | + | 750 | 74,3 |
| 18 | 44 | + | больше 5000 | 91,7 |
| 19 | 60 | + | 3000 | 85,0 |
| 20 | 60 | + | 2100 | 81,3 |
| 21 | 65 | + | 441 | 80,6 |
| 22 | 71 | + | 4048 | 88,6 |

Примечания. * Качественное определение: «+» — наличие IgG-антител к вирусу кори; «-» — отсутствие IgG-антител к вирусу кори. ** Количественное определение (в IU/L): < 200 IU/L — отрицательный результат; ≥ 200 < 275 IU/L — сомнительный результат; ≥ 275 IU/L — положительный результат. *** Авидность (%): < 40% — низкая авидность; ≥ 40–60% — серая зона; ≥ 60% — высокая авидность.

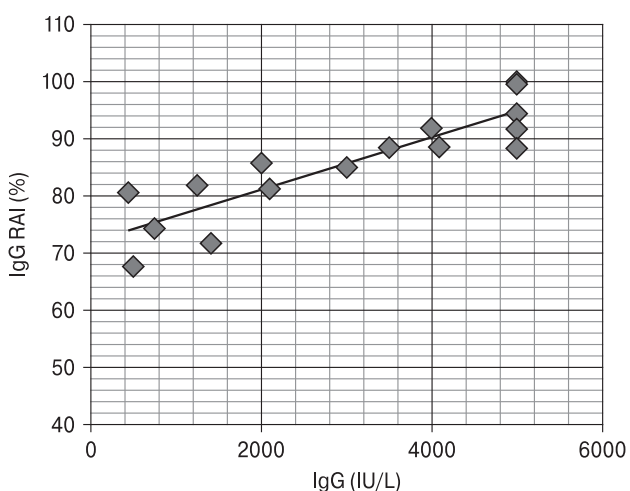


Рисунок 2. Зависимость содержания противокоревых IgG-антител и их авидности (R = 0,871176)

Результаты

При исследовании сывороток крови, полученных от 22 взрослых (5 женщин и 17 мужчин) IgM-корь-антитела не были выявлены ни в одном случае. Данные о наличии IgG-антител к вирусу кори, их титре и авидности представлены в таблице 1 и на рисунке 2.

Только у одного обследованного в возрасте 30 лет не были обнаружены IgG-антитела к вирусу кори.

У большинства обследованных (15 из 22 человек) определяли IgG-антитела в высоких титрах, равных или превышающих показатель 1000 IU/L, что не может быть следствием прививки, проводимой в этой стране детям в возрасте 9 месяцев, а свидетельствует о перенесенном ранее заболевании. Это подтверждается высокой авидностью антител у этих лиц (от 81 до 100%). Была выявлена небольшая группа лиц с низким титром антител (до 500 IU/L) низкой авидности (61,6–67,7%), что документирует недавно перенесенное заболевание.

При исследовании 116 сывороток крови от пациентов госпиталя г. Кинди, с помощью тест-системы «Вектор-Бест IgM-корь» ретроспективно были выявлены IgM-корь антитела в клиническом образце одного больного (оптическая плотность 0,685 при положительном контроле 0,321 и более). При этом IgG антитела у пациента отсутствовали, следовательно, он не был привит. В стационаре диагноз «корь» не был установлен. Полученные данные свидетельствуют о невыявленном случае кори.

При исследовании 130 сывороток крови больных, находившихся на стационарном лечении в госпитале г. Кинди, на наличие IgG-антител к вирусу кори, были выявлены 16 (12,3%) серонегативных к кори лиц: шестеро детей (37,5%) и шестеро лиц в возрасте 18–22 года (37,5%). Возраст еще четырех серонегативных к кори пациентов не установлен.

Все пациенты старше 23 лет имели антитела к вирусу кори (табл. 2).

Высокие титры IgG-антител регистрировали у 10 человек в возрасте до 22 лет (22,7±6,4%). В то же время, в группе лиц 23 года и старше аналогичные показатели определяли у достоверно большего числа пациентов, а именно у 33 человек (60±6,7%) (p < 0,05). Установленные значения титров антител являются, очевидно, показателем перенесенной в прошлом кори.

Высокие титры IgG-антител против кори выявлены и у двух детей в возрасте 2 г. 7 мес. (1600,0 и 3200,0 IU/L), что свидетельствует о недавно перенесенном заболевании. Вероятно, эти дети не были привиты.

Из 30 серопозитивных пациентов в возрасте до 22 лет, у большинства (66,7%) были обнару-

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СЫВОРОТОК ПАЦИЕНТОВ ПО ВОЗРАСТУ И ТИТРУ IgG-КОРЬ АНТИТЕЛ

| Оптическая плотность, IU/L | Возраст, лет | | | | | Всего |
|----------------------------|--------------|-------|-------|-------------|----|-------|
| | До 16 | 18–22 | 23–40 | 41 и старше | | |
| Менее 200,0 | 6 | 6 | – | – | 12 | 12,4% |
| 201,0–1000,0 | 10 | 10 | 6 | 16 | 42 | 87,6% |
| 1001,0–3000,0 | 3 | 2 | 6 | 7 | 18 | |
| > 3000,0 | 3 | 2 | 6 | 14 | 25 | |
| Всего | 22 | 20 | 18 | 37 | 97 | 100% |

жены антитела в титре до 1000 IU/L и это, вероятно, поствакцинальные антитела, сформировавшиеся после однократной иммунизации в возрасте 9 месяцев.

Изучение напряженности иммунитета к вирусу кори в Гвинейской Республике у лиц разного возраста показало, что все обследованные в возрасте 23 лет и старше были серопозитивны к вирусу кори, причем 60% из них имели высокие титры антител. Антитела к вирусу кори отсутствовали или определялись в низких титрах у 76,2% лиц в возрасте до 22 лет, что может свидетельствовать о нарушениях плановой вакцинации детей. Накопление когорты восприимчивых детей может привести к повышению заболеваемости корью вплоть до развития эпидемических вспышек кори в Гвинейской Республике.

Многолетний международный опыт глобальной борьбы с корью убедительно доказывает эпидемиологическую эффективность вакцинопрофилактики кори при достижении и поддержании высокого (95% и более) уровня охвата прививками подлежащих вакцинации контингентов.

Так, на территории Российской Федерации реализация программы элиминации кори

к 2010 г. [3, 4], разработанная в соответствии с резолюцией ВОЗ, способствовала существенному снижению заболеваемости корью, укреплению национальной системы иммунизации против этой инфекции, совершенствованию эпидемиологического надзора за корью и другими экзантемными заболеваниями. В России более 95% детей привито двумя дозами живой коревой вакцины [1, 5].

В 2015 г. в Российской Федерации зарегистрировано 843 случая кори, показатель составил 5,8 на 1 млн человек; на территориях, курируемых Санкт-Петербургским региональным центром по надзору за корью и краснухой (11 территорий Северо-Запада России), было выявлено 5 случаев кори, показатель — 0,37 на 1 млн человек.

Всемирная организация здравоохранения отмечает, что «любые перебои в области оказания услуг по иммунизации, даже кратковременные, приводят к росту числа людей, восприимчивых к инфекции, и повышают вероятность возникновения вспышек болезней, предотвратимых с помощью вакцин» [10]. Для снижения риска возникновения крупных вспышек кори в районах, свободных от передачи вируса Эбола, ВОЗ рекомендует проводить кампании массовой противокоревой вакцинации.

Список литературы/References

- Бичурина М.А., Железнова Н.В., Лялина Л.В., Антипова А.Ю., Тимофеева Е.В. Успехи и проблемы на этапе сертификации территорий Северо-Западного федерального округа на отсутствие эндемичной кори // *Инфекция и иммунитет*. 2012. Т. 2, № 1–2. С. 503–504. [Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lyalina L.V., Antipova A.Yu., Timofeeva E.V. Successes and challenges in the process of certifying areas of the North-Western federal district for the absence of endemic measles. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 1–2, pp. 503–504. (In Russ.)]
- Бичурина М.А., Тимофеева Е.В., Железнова Н.В., Игнатъева Н.А., Шульга С.В., Лялина Л.В., Дегтярев О.В. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 году // *Журнал инфектологии*. 2013. Т. 5, № 2. С. 96–102. [Bichurina M.A., Timofeeva E.V., Zheleznova N.V., Ignatieva N.A., Shulga S.V., Lyalina L.V., Degtyarev O.V. Measles outbreak in the Children's Hospital in Saint-Petersburg, 2012. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 96–102. (In Russ.)]
- Национальная программа элиминации кори к 2010 году. Приказ МЗ РФ № 270 от 19.08.2002. [National programme for the elimination of measles by 2010. Ministry of health order No. 270 (19.08.2002).]
- Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Лазикова Г.Ф., Мельникова А.А., Ватолина А.А., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г. Реализация программы ликвидации кори в Российской Федерации // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011. № 4. С. 51–56. [Onischenko G.G., Ezhlova E.B., Lazikova G.F., Melnikova A.A., Vatolina A.A., Tikhonova N.T., Gerasimova A.G. Implementation of measles elimination program in Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 51–56. (In Russ.)]
- Тихонова Н.Т., Ежова Е.Б., Герасимова А.Г., Цвиркун О.В., Мамаева Т.А., Наумова М.А. Проблемы элиминации кори в Российской Федерации // *Инфекция и иммунитет*. 2012. Т. 2, № 1–2. С. 522–523. [Problems of measles elimination in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 1–2, pp. 522–523. (In Russ.)]

6. Элиминация кори и краснухи и предупреждение врожденной краснушной инфекции. Стратегический план Европейского региона ВОЗ 2005–2010 гг. ВОЗ, 2005. 31 с. [Eliminatsiya kori i krasnukhi i preduprezhdenie vrozhdennoi krasnushnoi infektsii. Strategicheskii plan Evropeiskogo regiona VOZ 2005–2010 gg. WHO, 2005. 31 p.]
7. CDC. Measles outbreak. Hennepin County, Minnesota MMWR Weekly. 2011, vol. 60, no. 13, p. 421.
8. Global distribution of the measles and rubella genotypes – update. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2006, vol. 81, pp. 469–480.
9. Kutty P., Rota J., Bellini W., Redd S.B., Barskey A., Wallace G. CDC. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. May 20, 2011.
10. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2016 global summary. URL: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=RUS (10 october 2016)

Авторы:

Попова А.Ю., Главный государственный санитарный врач Российской Федерации, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), Москва, Россия;

Бичурин М.А., д.м.н., зав. вирусологической лабораторией центра по элиминации кори и краснухи ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Лаврентьева И.Н., д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Железнова Н.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Антипова А.Ю., к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Щербачева С.А., д.б.н., зам. директора по научной и экспериментальной работе, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Буаро М.Й., профессор, директор НИИ прикладной биологии Гвинеи, г. Кинди, Гвинейская Республика;

Тотолян Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Popova A.Yu., Chief State Sanitary Physician of the Russian Federation, Head of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, Russian Federation;

Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Virology Laboratory by Elimination Measles and Rubella, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Lavrentieva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zheleznova N.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Antipova A.Yu., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Shcherbakova S.A., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Scientific and Experimental Work, Federal State Institute of Healthcare, Russian Scientific and Research Antiplague Institute «Mikrob», Saratov, Russian Federation;

Boiro M.Y., Professor, General Director, Institute of Applied Biology in Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ПЕРВИЧНЫХ ДОНОРОВ В Г. АСТАНА, КАЗАХСТАН

Ю.В. Останкова¹, А.В. Семенов^{1,2,3}, Ж.К. Буркитбаев⁴, Т.Н. Савчук⁴,
Арег А. Тотолян^{1,2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Научно-производственный центр трансфузиологии, Астана, Казахстан

Резюме. Широкая распространенность одного из гепатотропных вирусов, вируса гепатита В (ВГВ), остается серьезнейшей проблемой мирового здравоохранения. Так как ВГВ передается при контакте с кровью или иными жидкостями организма инфицированного человека, безопасность крови является одним из главных вопросов здравоохранения в регионах с высоким уровнем распространенности вируса. Наблюдаемая в последние годы тенденция к смещению распространенности тех или иных генотипов ВГВ в различных географических ареалах за счет иммиграции из регионов мира с высокой частотой встречаемости гепатотропных вирусов, заставляет врачей и эпидемиологов обращать пристальное внимание на эпидемиологическую ситуацию в соседних странах. Целью нашей работы было изучение особенностей генетической структуры ВГВ у первичных доноров в г. Астана, Казахстан. Обследовано 30 образцов плазмы донорской крови с впервые выявленным вирусным гепатитом В (HBsAg+) из г. Астана. ДНК ВГВ была обнаружена в 27 образцах из представленных 30. На основании филогенетического анализа 27 изолятов показано, что в обследованной группе был выявлен преимущественно генотип D, являющийся наиболее распространенным генотипом ВГВ в Центральной Азии. При этом преобладал ВГВ субтипа D1 (85,2%) по сравнению с ВГВ субтипа D2 (3,7%) и субтипа D3 (7,4%), в одном образце был выявлен ВГВ генотипа А субтипа А1 (3,7%). Высокое сходство выявленных изолятов с ранее описанными в Иране, Судане, Монголии, Тунисе позволяет предположить многочисленные независимые, возможно обоюдные, завозы вируса в страну, в том числе в ходе крупных миграционных волн, несмотря на наличие изолятов, свидетельствующих о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе. Впервые обнаруженный на территории Казахстана ВГВ субтипа А1, нехарактерного для данного региона, а также субтипы D2 и D3, имеющие высокое сходство нуклеотидных последовательностей с ВГВ в РФ, свидетельствуют о случаях завоза вируса из других стран. Выявление особенностей распространения и роль «завозных» генотипов ВГВ в циркуляции вируса могут иметь существенное значение для регионов, где распространенность гепатотропных вирусов высока, а структура генома и пути их распространения недостаточно изучены.

Ключевые слова: гепатит В, молекулярная эпидемиология, секвенирование, доноры крови, безопасность крови, HBsAg-положительные доноры, Казахстан.

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-20-92 (служебн).
E-mail: shenna1@yandex.ru

Contacts:

Julia V. Ostankova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-20-92 (office).
E-mail: shenna1@yandex.ru

Библиографическое описание:

Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н.,
Тотолян Арег А. Генетические варианты вируса гепатита В у первичных
доноров в г. Астана, Казахстан // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4.
С. 359–366. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-359-365

Citation:

Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T.N.,
Totolian Areg A. Genetic variants of hepatitis B virus in primary donors
in Astana, Kazakhstan // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 359–366.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-359-365

GENETIC VARIANTS OF HEPATITIS B VIRUS IN PRIMARY DONORS IN ASTANA, KAZAKHSTANOstankova Yu.V.^a, Semenov A.V.^{a,b,c}, Burkitbayev Z.K.^d, Savchuk T.N.^d, Totolian Areg A.^{a,b}^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation^b Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^c North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation^d Research-Production Center of Transfusiology, Astana, Kazakhstan

Abstract. The prevalence of one of the hepatotropic virus, hepatitis B virus (HBV) remains a serious global health problem. Since hepatitis B is transmitted through contact with blood or other fluids of an infected person, blood safety is one of the major public health issues in regions with high virus prevalence. Observed in recent years the trend to a shift in the prevalence of various genotypes of HBV in different geographical areas due to immigration from regions of the world with a high incidence of hepatotropic viruses, makes doctors and epidemiologists to pay close attention to the epidemiological situation in neighboring countries. The aim of our work was to study the characteristics of the genetic structure of the HBV in primary donors in Astana, Kazakhstan. A total of 30 blood plasma samples from newly diagnosed hepatitis B (HBsAg+) of Astana. HBV DNA was detected in 27 samples out of 30. Based on the phylogenetic analysis of the isolates showed that among patients examined HBV identified mainly D genotype, which is the most common genotype of HBV in Central Asia. Thus HBV subtype predominant D1 (85,2%) compared to the HBV subtype D2 (3,7%) and subtype D3 (7,4%), in a single sample was detected HBV genotypes A subtype A1. High similarities identified isolates previously described in Iran, Sudan, Mongolia, Tunisia suggest numerous independent, perhaps mutual, the importation of the virus in the country, including in the major migration waves. First detected at the territory of Kazakhstan HBV subtype A1, uncharacteristic for the region, as well as subtypes D2 and D3, which have a high similarity with the nucleotide sequences of HBV in Russia, show cases of importation of the virus from other countries. Identification of the propagation and the role of «imported» genotypes of HBV virus in circulation may be essential for regions where the prevalence of hepatotropic viruses is high, and the genome structure and the way of their distribution sufficiently studied.

Key words: hepatitis B, molecular epidemiology, DNA HBV, blood donors, blood safety, HBsAg-positive donor, Kazakhstan.

Введение

Широкая распространенность одного из гепатотропных вирусов, вируса гепатита В (ВГВ), остается серьезнейшей проблемой мирового здравоохранения. Согласно данным ВОЗ, количество инфицированных вирусом гепатита В в мире составляет почти 2 млрд человек. При этом хронический вирусный гепатит В (ХВГВ), являющийся одной из причин таких тяжелых заболеваний печени как цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома, развивается более чем у 240 млн человек [21]. Различные регионы мира демонстрируют высокую распространенность ВГВ (> 8%) — страны Африки и Азии, и низкую распространенность вирус (< 2%) — страны Европы и Северной Америки. Наиболее широко вирус распространен в странах Азии, Африки, Южной Европы и Латинской Америки.

Инфицирование ВГВ в зрелом возрасте приводит к развитию хронического гепатита менее чем в 5% случаев, однако при инфицировании в детском возрасте вероятность хронизации возрастает, достигая 25–50% случаев при заражении до 6 лет и 90% случаев при инфицировании в пре- и неонатальном периоде.

Клинические проявления ХВГВ многообразны и зависят от многих факторов, в том числе от биологических свойств вируса, длительности заболевания, уровня вирусной нагрузки, мутаций вируса, экологических и генетических факторов. ВГВ свойственна высокая степень

генетической гетерогенности, приводящая к тому, что в настоящий момент ВГВ подразделяют на десять генотипов, отличающихся друг от друга по составу нуклеотидных последовательностей более чем на 8% и на 34 субтипа, отличающихся на 4–7,5% и распространенных в различных географических регионах мира.

Так как ВГВ передается при контакте с кровью или иными жидкостями организма инфицированного человека, безопасность крови является одним из главных вопросов здравоохранения в регионах с высоким уровнем распространенности вируса. Несмотря на постоянное усиление мер по повышению безопасности переливания компонентов и продуктов крови, появление инфекционных агентов, которые могут быть переданы при трансфузиологических манипуляциях, остается серьезной проблемой для трансфузиологической медицины, так как в настоящее время нет универсального способа, который может применяться ко всем компонентам крови и быть одинаково эффективным против всех вирусов.

Согласно литературным данным, существует целый ряд обстоятельств, по которым больные ХВГВ могут не знать о своем заболевании и становиться донорами крови и ее компонентов. Так, к обстоятельствам общественного здравоохранения, относят низкий уровень контроля за обеззараживанием инструментов в частных косметологических и стоматологических салонах и кабинетах, а также отсутствие доступа

к медицинскому обслуживанию и специфической медицинской помощи в некоторых регионах, а к индивидуальным обстоятельствам — низкую информированность, общее хорошее самочувствие пациентов [16]. Еще два значимых индивидуальных фактора — недоверие к медицине и страх инвазивных вмешательств также имеют место, но не характерны для доноров крови. Кроме того, нередки случаи, когда для донорства крови в медицинские центры приходят люди, знающие или подозревающие о своем инфекционном статусе, например, для получения бесплатного обследования [7, 12].

Хотя введение в клиническую практику эффективной вакцины против ВГВ значительно снизило циркуляцию вируса, наблюдаемая в последние годы тенденция к смещению распространности тех или иных генотипов ВГВ в различных географических ареалах за счет иммиграции из регионов мира с высокой частотой встречаемости гепатотропных вирусов, заставляет врачей и эпидемиологов обращать пристальное внимание на эпидемиологическую ситуацию в соседних странах [9]. Особенно актуальным это становится в свете активной «трудовой миграции» в другие государства и, в том числе, в Российскую Федерацию жителей стран Средней Азии, вошедших в десятку стран с наибольшей смертностью от цирроза, вызванного вирусными гепатитами [15]. И здесь снова необходимо вернуться к «низкой информированности населения» как к одному из уже упоминавшихся выше факторов, способствующих распространению вируса. В большинстве случаев трудовые мигранты из Средней Азии не знают о своих заболеваниях и избегают медицинского обследования на социально значимые инфекции, так как опасаются депортации, причем более 46,4% приезжих вообще не слышали о ВГВ [1].

Несмотря на то, что уже многие годы ведутся исследовательские работы по генотипированию гепатотропных вирусов на территории РФ и в сопредельных государствах, все еще нет полного генотипического картирования изолятов ВГВ, выделяемых на территории СНГ и стран бывшего СССР.

Целью нашей работы было изучение особенностей генетической структуры ВГВ у первичных доноров в г. Астана, Казахстан.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы плазмы донорской крови 30 больных с впервые выявленным вирусным гепатитом В (положительный результат обследования на наличие поверхностного антигена ВГВ, HBsAg) без коинфекций с вирусом иммунодефицита челове-

ка (ВИЧ) и вирусом гепатита С (ВГС), полученные в 2012 г. от жителей Казахстана, г. Астана. Образец крови от каждой донации обследовали на маркеры четырех гемотрансмиссивных инфекций: ВИЧ (антиген р24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1/2), ВГВ (поверхностный антиген ВГВ, HBsAg), ВГС (антитела к ВГС); сифилис (антитела класса М и G к бледной трепонеме). Первично реактивные образцы тестировали повторно в двух постановках тем же методом, подтверждающее исследование инфекции при HBsAg+ выполняли с использованием диагностикума «Вектогеп В-HBsAg» [5].

Исследование было одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Для первичного выявления ВГВ из плазмы крови выделяли нуклеиновые кислоты (НК) с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Для всех образцов проводили предварительное концентрирование вируса ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 ч при 24 000g, +4°C.

Для ПЦР с последующим секвенированием использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент протяженностью 1475 пар оснований (п.о.), включающий рекомендованный для генотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 п.о., область 2848–3182...1–835 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [10].

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-HCl, (pH 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 10% DMSO, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 5 мин устанавливали 30–40 циклов амплификации в режиме: 95°C — 20–40 с, 55–65°C — 20–30 с, 72°C — 30–90 с; затем финальная элонгация при 72°C — 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1 x TBE), окрашенном бромистым этидием.

Для амплификации, секвенирования и детекции продукта использовали специфические праймеры (Синтол, Россия), последовательность которых брали из литературных источников, а также подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST согласно общепринятым рекомендациям.

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору GenomeLabTMDTCS — Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., США), в трех повторях, на прямых и обратных праймерах. Реакционная смесь для секвенирующей реакции включала: DTCS Quick Start Master Mix (8 мкл), прямой или обратный праймер (1,6 мкМ), очищенный продукт амплификации (объем зависел от концентрации), воду до конечного объема 20 мкл. Постановку реакции осуществляли на термоциклере BIO-RAD CFX384 в режиме: 25 циклов амплификации 96°C — 20 с; 50°C — 20 с; 60°C — 4 мин.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по следующей методике: смесь из 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 0,125М EDTA и 1 мкл гликогена вносили в 20 мкл продукта амплификации и инкубировали при комнатной температуре в присутствии охлажденного 96% этилового спирта 15 мин. Центрифугировали при 14 000 об./мин, 4°C, 15 мин. Супернатант удаляли и дважды промывали осадок охлажденным 70% этиловым спиртом, повторяя процедуру центрифугирования на холоду. Промытый осадок сушили.

Для контроля качества очищения продуктов амплификации осадок растворяли в 30 мкл воды и проводили оценку в 1,5% агарозном геле с добавлением раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Очищенный фрагмент достаточной концентрации использовали для постановки секвенирующих реакций.

Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере, содержащем формамид, и помещали в генетический анализатор GenomeLab GXp (Beckman Coulter).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA, версия 5, используя алгоритм ClustalW [11]. Поскольку для всех выбранных для секвенирования регионов вирусных гепатитов показана высокая скорость эволюции, для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей, позволяющим оптимизировать дерево в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции» (Neighbor-joining), для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) анализ для 500 повторов [18].

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что в 2012 г. в г. Астана были обследованы 28 248 доноров, сделавших 41 990 донаций крови и ее компонентов, повторные доноры выполнили 24 378 донаций, средняя частота донаций составила 2,29 раза в год. При этом HBsAg+ выявлен у 383 первичных и 36 повторных доноров [5]. Таким образом, представленные в нашей работе 30 пациентов с HBsAg+ составили 7,2% от общего количества доноров крови с выявленным поверхностным антигеном ВГВ в 2012 г. в г. Астана, что говорит о репрезентативности выборки.

ДНК ВГВ была обнаружена в 27 образцах из представленных 30. Для всех выявленных образцов была получена нуклеотидная последовательность Pre-S1/Pre-S2/S региона удовлетворительного качества, пригодная для дальнейшего анализа. Для всех образцов были определены генотип и субтип вируса. На основании филогенетического анализа 27 изолятов показано, что в обследованной группе был выявлен преимущественно генотип D, являющийся наиболее распространенным генотипом ВГВ в Центральной Азии. При этом преобладал ВГВ субтипа D1 (85,2%) по сравнению с ВГВ субтипа D2 (3,7%) и субтипа D3 (7,4%), в одном образце был выявлен ВГВ генотипа А субтипа А1 (3,7%) (рис.).

Несмотря на то, что, согласно литературным данным, в Средней Азии ранее выявляли также генотипы А и С, а не только ВГВ генотипа D, распространенность генотипов ВГВ в отдельных странах и регионах этого ареала недостаточно изучена. Генотипирование и глубокое субтипирование изолятов ВГВ в Казахстане проведено впервые в данной работе.

В представленной группе преобладают мужчины по сравнению с женщинами (81,48 и 18,52% соответственно), несмотря на активное участие женщин Казахстана в донорских программах, лишь немногим меньше, чем участие мужчин. Следует также отметить, что только у мужчин обнаружен ВГВ субтипов D2, D3, А1, что, по всей видимости, может быть связано с культурными традициями Казахстана и меньшей мобильностью женщин по сравнению с мужчинами.

Все пациенты обследованной группы проживали в г. Астана, в связи с чем выявленное нами разнообразие субтипов ВГВ свидетельствует об отсутствии связи генотипа вируса и данного географического региона Казахстана.

Известно, что на большей части территории бывшего СССР и в странах Балтийского региона преобладает ВГВ субтипа D2, показаны субтипы А2 и D3 [20], в то время как для стран Средней Азии распределение субтипов ВГВ смещается в сторону преобладания субтипа D1.

Так, ранее мы показывали высокую распространенность ВГВ субтипа D1 в соседствующих с Казахстаном Узбекистане и Кыргызстане, где частота встречаемости данного субтипа составила 84,38 и 73,34% соответственно, в то время как распространенность субтипа D2 не превышала 3,5% [2, 4]. Таким образом, высокая встречаемость субтипа D1 и, фактически, единственный случай выявления ВГВ субтипа D2 полностью соответствуют ранее полученным нами данным по молекулярно-генетической характеристике ВГВ в Средней Азии.

Как известно для ВГВ описаны как половой, так и парентеральный пути передачи, в том числе с половым путем связывают ВГВ субтипа D1, а для субтипа D3 показано преимущественное распространение с инъекционными наркотиками [19]. Однако, в связи с тем, что все пациенты обследованной нами группы являются донорами крови, вероятнее всего, все они были инфицированы половым путем. Преимущественное распространение в группе генотипа D связано, по всей видимости, с горизонтальным путем передачи вируса и отсутствием прививок против ВГВ у данных пациентов, так как описано разделение путей передачи вируса и его генотипов после введения вакцинации в Средней Азии, в том числе с горизонтальным распространением ВГВ генотипа D у не привитых людей [6].

Согласно представленной дендрограмме, выделяются три кластера происхождения вируса генотипа D.

При анализе последовательностей общей группы изолятов субтипа D1, выявленных в нашей работе и характерных для Средней Азии, процент идентичности нуклеотидной последовательности составил $98,5 \pm 0,7\%$. При сравнительном филогенетическом анализе изолятов ВГВ субтипа D1, и изолятов, представленных в международной базе данных GenBank, становится очевидным, что среди изолятов D1 происходит разделение на подгруппы. Процент идентичности был выше, а количество нуклеотидных модификаций меньше при изолированной оценке идентичности подкластеров D1. При этом ВГВ субгенотипа D1, очевидно имеет несколько независимых источников инфицирования. Так, выделяются подкластеры изолятов, имеющих высокое сходство с ВГВ, ранее описанном в Иране, Судане, Монголии, Тунисе. Высокое сходство изолятов с описанными в международной базе данных образцами из разных стран является, по всей видимости, подтверждением многочисленных независимых завозов вируса в страну, в том числе в ходе крупных миграционных волн. Однако также обнаруживаются небольшие подкластеры, имеющие значительно меньшее сходство с ранее депонированными в базу данных изолятами, что,

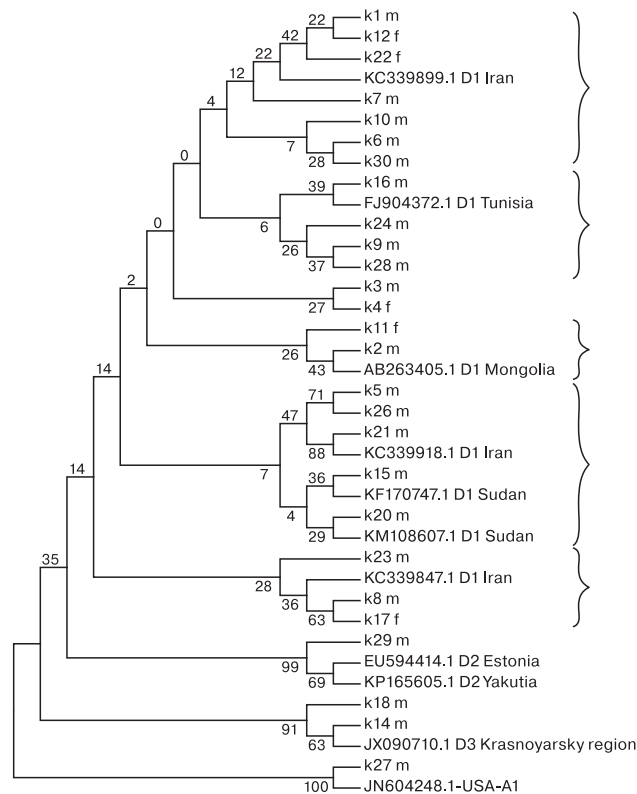


Рисунок. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГВ, выделенных от пациентов из Казахстана, в сравнении с изолятами, представленными в международной базе данных GenBank

вероятно, свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе.

Единственный обнаруженный в группе изолятов ВГВ субтипа D2 был получен от пациента восточно-европейского происхождения, то есть из региона с высокой встречаемостью именно этого субтипа вируса. Как и в ранее описанных нами единичных случаях выявления ВГВ D2 в Средней Азии, учитывая высокие частоты распространяемости гепатотропных вирусов в ходе миграций, мы, вероятно, имеем дело с завозом штамма с европейской части территории бывшего СССР, а также не можем исключить возможность «опосредованного» завоза. Подтверждает наше предположение тот факт, что ранее схожие изоляты были описаны в Эстонии, а также обнаружены нами в Якутии [3].

Несмотря на низкую вероятность употребления инъекционных наркотических веществ представленными в группе пациентами, высокое сходство нуклеотидных последовательностей двух обнаруженных изолятов ВГВ субтипа D3, составившее более 99%, не позволяет нам полностью игнорировать возможность существования данного пути передачи в случае сокрытия его потенциальными донорами. Однако также мы не можем исключить и иные пути

передачи вируса. Следует отметить, что ВГВ с высокой схожестью нуклеотидных последовательностей с подобными D3-изолятами ранее обнаруживали в разных странах мира, в том числе в Бразилии и в различных регионах РФ.

Данные, полученные в настоящем исследовании, могут помочь в понимании филогенеза и путей распространения ВГВ генотипа D, в той или иной степени встречающегося во всем мире, но чье происхождение все еще обсуждается. Несмотря на предположительно изначальное возникновение ВГВ из Африки, именно Центральную Азию некоторые исследователи считают наиболее вероятным регионом происхождения общего предка ВГВ субтипов D1-D3 [22].

Обращает на себя внимание изолят ВГВ субтипа A1, являющегося доминирующим субтипом на африканском континенте, при этом распространение данного субтипа за пределами Африки связывают с историческими миграционными волнами в IX–XIX вв. в Индию и Латинскую Америку [13]. Широкое распространение ВГВ субтипа A1 описано также в Бразилии, что, по всей видимости, является следствием более поздней «миграционной» волны, так как является преимущественно у чернокожих и мулатов [8], подтверждая предположение о завозе вируса с пленниками, вывезенными из Юго-Восточной Африки в середине XIX в. [14].

Для обнаруженного нами ВГВ субтипа A1 наиболее близким по нуклеотидной последовательности штаммом, представленным в между-

народной базе данных GenBank, оказался изолят JN604248.1, выявленный среди первичных доноров на северо-востоке США [17]. По всей видимости, ВГВ субтипа A1, как и изолят ВГВ субтипа D2, представляет собой «случайный» завоз вируса на территорию республики и требует более пристального внимания.

Заключение

Характер частоты распределения генотипов ВГВ в Республике Казахстан сходен с частотой распределения генотипов ВГВ, описанной для Средней Азии в целом. Так, остается общим преобладание ВГВ субтипа D1, подтверждается предположение о независимых заносах вируса в регион. Впервые обнаружен на территории Казахстана ВГВ субтипа A1, нехарактерного для данного региона, а также вирусы субтипов D2 и D3, имеющие высокое сходство нуклеотидных последовательностей с ВГВ в РФ, что свидетельствует о случаях завоза вируса из других стран. В связи с вышесказанным считаем необходимым предлагать возвращающимся в регион «трудовым мигрантам» и туристам пройти диагностику на ВГВ.

Выявление особенностей распространения и роль «завозных» генотипов ВГВ в циркуляции вируса могут иметь существенное значение для регионов, где распространенность гепатотропных вирусов высока, а структура генома и пути их распространения недостаточно изучены.

Список литературы/References

1. Иванова Л.Ю. Информированность трудовых мигрантов из разных регионов об опасных инфекционных заболеваниях: ВИЧ, ИППП, туберкулез, гепатит (на материалах опроса иностранных работников в Санкт-Петербурге // Социальные аспекты здоровья населения. № 4. 2015. [Ivanova L.Yu. Awareness of labor migrants from different regions about dangerous infectious diseases: HIV, STIS, tuberculosis, hepatitis (based on survey of foreign workers in St. Petersburg). *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya = Social Aspects of Public Health*, no. 4, 2015. URL: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/702/30/lang,ru> (In Russ.)]
2. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабаев Э.И., Тотолян Арег А. Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом/циррозом печени в Узбекистане // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 34–43. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Faizullaev H.N., Kazakova E.I., Kozlov A.V., Musabaev E.I., Totolian Areg A. Molecular biological markers of hepatitis B in patients with liver fibrosis/cirrhosis in Uzbekistan. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 34–43. (In Russ.)]
3. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В., Бичурина М.А., Мукомолов С.Л., Козлов А.В., Тотолян А.А. К вопросу о молекулярной эпидемиологии гепатита В в Республике Саха (Якутия) // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 57–65. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Gerasimova V.V., Bichurina M.A., Mukomolov S.L., Kozlov A.V., Totolian Areg A. To a question on the molecular epidemiology of hepatitis B in the Republic of Sakha (Yakutia). *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 57–65. (In Russ.)]
4. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Лаврентьева И.Н., Тобокалова С.Т., Тотолян Арег А. Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВГД в Кыргызстане // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 141–150. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Nogoibaeva K.A., Kasymbekova K.T., Lavrenteva I.N., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. Molecular epidemiology features of HBV/HDV co-infection in Kyrgyzstan. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-141-150 (In Russ.)]
5. Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б. Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови Астаны // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60 (1). С. 34–36. [Skorikova S.V., Burkitbayev J.C., Savchuk T.N., Zhiburt E.B. The prevalence of HIV-, HCV-, HBV-infection in blood donors in Astana. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60 (1), pp. 34–36. (In Russ.)]
6. Avazova D., Kurbanov F., Tanaka Y., Sugiyama M., Radchenko I., Ruziev D., Musabaev E., Mizokami M. Hepatitis B virus transmission pattern and vaccination efficiency in Uzbekistan. *J. Med. Virol.*, 2008, vol. 80, iss. 2, pp. 217–224. doi: 10.1002/jmv.21035

7. Allain J.P. This article has been retracted: trends in the frequency of blood donors donating blood to be tested for HIV in Shiraz from 2004 to 2006. *Transfus. Med.*, 2010, vol. 20, p. 127.
8. Bertolini D.A., Gomes-Gouvea M.S., Guedes de Carvalho-Mello I.M., Saraceni C.P., Sitnik R., Grazziotin F.G., Laurino J.P., Fagundes N.J., Carrilho F.J., Pinho J.R. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect. Genet. Evol.*, 2012, vol. 12(6), pp. 1295–1304. doi: 10.1016/j.meegid.2012.04.009.
9. Bissinger A.L., Fehrl C., Werner C.R., Lauer U.M., Malek N.P., Berg C.P. Epidemiology and genotyping of patients with chronic hepatitis B: genotype shifting observed in patients from Central Europe. *Pol. J. Microbiol.*, 2015, vol. 64(1), pp. 15–21.
10. Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., Césaire R., Gordien E. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.*, 2013, vol. 94 (pt. 10), pp. 2318–2329. doi: 10.1099/vir.0.055459-0
11. Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.*, 1992, vol. 8, pp. 189–191.
12. Kasraian L., Tavasoli A. Positivity of HIV, hepatitis B and hepatitis C in patients enrolled in a confidential self-exclusion system of blood donation: a cross-sectional analytical study. *Sao Paulo Med. J.*, 2010, vol. 128, pp. 320–323.
13. Kramvis A., Paraskevis D. Subgenotype A1 of HBV-tracing human migrations in and out of Africa. *Antivir. Ther.*, 2013, vol. 18 (3B), pp. 513–521. doi: 10.3851/IMP2657
14. Lago B.V., Mello F.C., Kramvis A., Niel C., Gomes S.A. Hepatitis B virus subgenotype A1: evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 8, e105317. doi: 10.1371/journal.pone.0105317
15. Mokdad A.A., Lopez A.D., Shahrz S., Lozano R., Mokdad A.H., Stanaway J., Murray C.J., Naghavi M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med.*, 2014, vol. 12, p. 145. doi: 10.1186/s12916-014-0145-y
16. Mössner B.K., Staugaard B., Jensen J., Lillevang S.T., Christensen P.B., Holm D.K. Dried blood spots, valid screening for viral hepatitis and human immunodeficiency virus in real-life. *World J. Gastroenterol.*, 2016, vol. 22, iss. 33, pp. 7604–7612. doi: 10.3748/wjg.v22.i33.7604
17. Rodríguez Lay L.A., Corredor M.B., Villalba M.C., Frómata S.S., Wong M.S., Valdes L., Samada M., Sausy A., Hübschen J.M., Muller C.P. Genetic diversity of the hepatitis B virus strains in Cuba: absence of West-African genotypes despite the Transatlantic Slave Trade. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 5, e0125052. doi: 10.1371/journal.pone.0125052
18. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, vol. 4, pp. 406–425.
19. Stanojević B., Osiowy C., Schaefer S., Bojović K., Blagojević J., Nešić M., Yamashita S., Stamenković G. Molecular characterization and phylogenetic analysis of full-genome HBV subgenotype D3 sequences from Serbia. *Infect. Genet. Evol.*, 2011, vol. 11, iss. 6, pp. 1475–1480. doi: 10.1016/j.meegid.2011.05.004
20. Tallo T., Tefanova V., Priimagi L., Schmidt J., Katargina O., Michailov M., Mukomolov S., Magnius L., Norder H. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.*, 2008, vol. 89, pp. 1829–1839. doi: 10.1099/vir.0.83660-0
21. WHO Prevention and control of viral hepatitis infection: frame work for global action 2012. *Geneva: WHO*, 2012.
22. Zehender G., Shkjezi R., Ebranati E., Gabanelli E., Abazaj Z., Tanzi E., Kraja D., Bino S., Ciccozzi M., Galli M. Reconstruction of the epidemic history of hepatitis B virus genotype D in Albania. *Infect. Genet. Evol.*, 2012, vol. 12, pp. 291–298. doi: 10.1016/j.meegid.2011.11.009

Авторы:

Останкова Ю.В., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Семенов А.В., к.б.н., зав. лабораторией вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ; доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Буркитбаев Ж.К., к.м.н., директор Научно-производственного центра трансфузиологии, Астана, Республика Казахстан;
Савчук Т.Н., зав. отделением лабораторных исследований трансфузионных инфекций, РГП на ПХВ Научно-производственного центра трансфузиологии, Астана, Республика Казахстан;
Тотолян Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Ostankova Ju.V., Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Semenov A.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Virology and Immunology HIV, St. Petersburg Pasteur Institute; Associate Professor, Pavlov First St. Petersburg State Medical University; Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Burkitbayev Z.K., PhD (Medicine), Director of Research-Production Center of Transfusiology, Astana, Kazakhstan Republic;
Savchuk T.N., Head of Department of Laboratory Studies of Transfusion Infections, Research-Production Center of Transfusiology, Astana, Kazakhstan Republic;
Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of St. Petersburg Pasteur Institute; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.11.2016
 Принята к печати 23.11.2016

Received 18.11.2016
 Accepted 23.11.2016

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА ПРИ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ

О.А. Коленчукова, С.В. Смирнова, А.М. Лаптева

ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

Резюме. Проведено исследование микробиоценоза слизистой оболочки носа у больных полипозным риносинуситом. Обследованы больные полипозным риносинуситом (ПРС, n = 58) в возрасте от 18 до 64 лет и группа контроля (n = 156), сопоставимые по полу и возрасту. Для оценки микрофлоры слизистой оболочки носа во время обострения заболевания проводили посев микроорганизмов на питательные дифференциально-диагностические среды (КА, ЖСА, Эндо, энтерококк-агар). При изучении микрофлоры, полученной со слизистой оболочки носа, было выявлено 407 культур микроорганизмов при ПРС. В группе контроля выявлено 174 культуры микроорганизмов. Среди изолятов установлено 9 видов 6 родов бактерий при ПРС против 8 видов 6 родов в группе контроля. При исследовании количественного состава микрофлоры слизистой оболочки носа при ПРС относительно контрольной группы было обнаружено значительное преобладание микроорганизмов, принадлежащих к родам *Staphylococcus* и *Streptococcus*, а также к семейству *Enterobacteriaceae*. Также обнаружено повышение КОЕ *S. pneumoniae*. При определении видовой принадлежности микроорганизмов, относящихся к роду *Staphylococcus*, в группе ПРС относительно контроля было установлено увеличение общей численности штаммов *S. aureus*, относящихся к коагулазопозитивным и *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* относящихся к коагулазонегативным стафилококкам. Также выявлено большое разнообразие коагулазонегативных стафилококков: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* и *S. xylosus*. В контрольной группе таких видов как *S. capitis* и *S. hyicus* не обнаружено. Таким образом при полипозном риносинусите на слизистой оболочке носа имеет место выраженный дисбактериоз. Анализ частоты встречаемости микроорганизмов, принадлежащих к разным родам, показал, что в группе ПРС чаще по сравнению с контрольной группой выделялись бактерии рода *Streptococcus* и семейства *Nesseria*, а также *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *M. catarrhalis*, относительно контроля. Анализ частоты встречаемости бактерий, относящихся к роду *Staphylococcus*, выделенных со слизистой оболочки носа показал высокий процент обнаружения как коагулазоположительных стафилококков, к которым относится золотистый стафилококк, так и коагулазотрицательных, таких как *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* и *S. xylosus* в группе ПРС относительно контроля. Проведенный анализ вирулентных и персистентных свойств стафилококков выявил особенности ферментативного аппарата, определяющего клиническое течение заболевания: стафилококки, длительно вегетирующие на слизистой оболочке носа изменяют свои свойства в сторону повышения устойчивости к бактерицидному воздействию естественной резистентности, что, вероятно, сообщает им дополнительные селективные преимущества при развитии воспалительного процесса.

Ключевые слова: микробиоценоз, вирулентность, персистенция, видовой принадлежность, резистентность, полипозный риносинусит.

Адрес для переписки:

Коленчукова Оксана Александровна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера.
Тел.: 8 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62.
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru

Contacts:

Oksana A. Kolenchukova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, P. Zheleznyaka str., 3g,
Scientific Research Institute of Medical Problems of the North.
Phone: +7 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62.
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru

Библиографическое описание:

Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Лаптева А.М. Количественный и качественный состав микрофлоры слизистой оболочки носа при полипозном риносинусите // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 366–372. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-366-372

Citation:

Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Lapteva A.M. Nasal mucous membrane Microflora in patients with polypous rhinosinusitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 366–372. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-366-372

NASAL MUCOUS MEMBRANE MICROFLORA IN PATIENTS WITH POLYPOUS RHINOSINUSITIS**Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Lapteva A.M.***Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Abstract. Nasal mucous membrane microbiocenosis Research amongst patients with polypous rhinosinusitis is conducted. Patients with polypous rhinosinusitis (PRS, n = 58) aged from 18 till 64 years and group of control (n = 156). For an microflora assessment of nasal mucous membrane during an exacerbation of a disease carried out crops of microorganisms on nutrient differential and diagnostic agars. When studying the microflora received from nasal mucous membrane 407 cultures of microorganisms at PRS were revealed. In control group of 174 microorganisms cultures are revealed. Among isolates were established 6 genera of 9 species of bacteria at PRS against 6 genera and 8 species in group of control. Microflora quantitative structure research of nasal mucous membrane at PRS of rather control group considerable prevalence of the microorganisms belonging to the sorts *Staphylococcus* and *Streptococcus*, and also to *Enterobacteriaceae* was revealed. It is also revealed increase *S. pneumoniae*. When determining specific accessory of the microorganisms relating to the *Staphylococcus* genera in PRS group concerning control the increase in total number of the strains of *S. aureus* relating to coagulase-positive and *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* relating to coagulase-negative staphylococcus was established. A big variety the coagulase-negative of Staphylococcus is also revealed: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* and *S. xylosus*. In control group of such types as *S. capitis* and *S. hyicus* isn't revealed. Thus at a polypous rhinosinusitis nasal mucous membrane the expressed dysbacteriosis takes place. The analysis of frequency of occurrence of the microorganisms belonging to different childbirth showed that in PRS group bacteria of the sort *Streptococcus* and this *Nesseria*, and also *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* were most often allocated concerning control. The frequency prevalence analysis of the genera *Staphylococcus* related bacteria, allocated from nasal mucous membrane showed high detection percent as the coagulase-positive of *Staphylococcus* which to treat golden staphylococcus, and the coagulase-negative staphylococcus, such as *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* and *S. xylosus* in PRS group concerning control. The carried-out analysis virulent and the persistent of properties of *Staphylococcus* revealed features of the enzymatic device defining the clinical course of a disease: staphylococcus, it is long vegetative on a mucous membrane of a nose change the properties towards increase of resistance to bactericidal influence of natural resistance that probably tells them additional selective benefits at development of inflammatory process.

Key words: *microbiocenosis, virulence, persistence, species affinity, resistance, polypous rhinosinusitis.*

Очевидно, что дисбиоз и вторичные иммунные нарушения — состояния неразделимые. Ключевая роль нормального микробиоценоза в адаптации (или дезадаптации при дисбиозе), подтверждает тезис И.И. Мечникова об основополагающей роли дисбактериоза в развитии патологических процессов [2, 5, 8]. Сопоставления показателей микробиоценоза с особенностями течения воспалительного заболевания показало, что тяжесть патологического процесса зависит от степени негативных изменений микробиологических показателей, что по нашему мнению диктует необходимость исследования микробиоценозов при различных заболеваниях и необходимости коррекции дисбиозов в комплексной терапии заболевания. Дисбиоз можно рассматривать как фактор этиологии, либо как фактор, предрасполагающий к развитию патологического процесса [1, 4, 9, 13].

Возникновение полипозных изменений слизистой оболочки с формированием в последующем полипов носа и околоносовых пазух можно рассматривать как продолжение развития продуктивного процесса вследствие иммунопатологических изменений, в основе которых могут лежать нарушения микробной колонизации. Рядом исследователей у 27,3% больных полипозным риносинуситом (ПРС) были вы-

явлены положительные кожные пробы к одному, а у 54,2% пациентов — к нескольким бактериальным антигенам. Чаще у этих пациентов наблюдалась сенсibilизация стафилококком и стрептококком [3, 10, 11, 12].

Таким образом целью исследования являлось определение микробиоценоза слизистой оболочки носа у больных ПРС.

Материалы и методы

Обследованы больные ПРС (n = 58) в возрасте от 18 до 64 лет. Группу контроля составляли практически здоровые доноры крови ГБУЗ «Красноярского краевого центра крови № 1» (n = 156), сопоставимые по полу и возрасту. Диагностика аллергического риносинусита основывалась на комплексном обследовании больных оториноларингологом и аллергологом-иммунологом. При постановке диагноза ПРС использованы стандартные общеклинические методы с учетом дифференциальной диагностики атопических заболеваний и ринитов.

Для оценки микрофлоры слизистой оболочки носа во время обострения заболевания проводили посев микроорганизмов на питательные дифференциально-диагностические среды (КА, ЖСА, Эндо, энтерококк-агар). Для взятия

образцов патологического материала со слизистой оболочки носа и транспортировки для дальнейших исследований использовались стерильные тупферы с коммерческой транспортной средой Эймса. Посев проводили секторным методом. Инкубировали в термостате при температуре 37°C в течении 24 часов. Подсчет микроорганизмов проводили по расчетной таблице.

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

Результаты

При исследовании количественного состава микрофлоры слизистой оболочки носа при ПРС относительно контрольной группы было обнаружено значительное преобладание микроорганизмов, принадлежащих к родам *Staphylococcus* и *Streptococcus*, а также к семейству *Enterobacteriaceae*. Также обнаружено повышение КОЕ *S. pneumoniae* (табл. 1). При этом в группе больных ПРС по сравнению с контрольной группой не обнаружено некоторых представителей условно-патогенной микрофлоры (энтерококки и гемофильная палочка) которые,

по данным различных исследований, выявляются на слизистой оболочке носа довольно часто [7]. Обращает на себя внимание, что количественный состав грамотрицательной микрофлоры слизистой оболочки носа при ПРС имеет тенденцию к увеличению. Появление несвойственных для этого биотопа микроорганизмов позволяет предположить дисбиотические изменения. Не совсем обычная локализация этих бактерий может приводить к развитию воспалительного процесса, а согласно данным литературы эти бактерии обладают выраженной сенсibiliзирующей активностью [9].

При определении видовой принадлежности микроорганизмов, относящихся к роду *Staphylococcus*, в группе ПРС относительно контроля было установлено увеличение общей численности штаммов *S. aureus*, относящихся к коагулазопозитивным и *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* относящихся к коагулазонегативным стафилококкам. Коагулазопозитивные стафилококки являются высоковирулентными бактериями, которые при ослаблении иммунной системы могут вызывать различные воспалительные заболевания носа и околоносовых пазух. Согласно данным литературы, *S. aureus* является патогенной флорой и обладает выраженным сенсibiliзирующим свойством. Также известно, что токсины, полученные из золотистого и эпидермального стафилококков, угнетают двигательную активность мерцательного эпителия и затрудняет транспорт секрета; кроме того при воздействии золотистого стафилококка наблюдается гемолиз эритроцитов [16]. Выявлено большое разнообразие коагулазонегативных стафилококков: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* и *S. xylosum*. В контрольной группе

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА У БОЛЬНЫХ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНОСИТОМ

| Показатели, КОЕ/мл | Me (C_{25} – C_{75}) | | |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------|
| | Контроль, n = 156 | ПРС, n = 58 | P |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 5550 (100–105 050) | 900 000 (2100–1 020 000) | = 0,040 |
| <i>Streptococcus</i> spp. | 1000 (100–1000) | 8 500 000 (500 000–9 000 000) | = 0,029 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> spp. | 5500 (55–10 000) | 100 000 (100 000–100 000) | = 0,032 |
| <i>Micrococcus</i> spp. | 1000 (550–1000) | 50 500 (1000–100 000) | |
| <i>Nisseria</i> spp. | 1000 (1000–1000) | 5000 (5000–5000) | |
| <i>S. pyogenes</i> | 0 | 10 000 (1000–15 000) | |
| <i>M. catarrhalis</i> | 1000 (0–1000) | 15 000 (1000–42 000) | |
| <i>S. aureus</i> | 200 (0–200) | 52 550 (100–500 000) | |
| <i>S. epidermidis</i> | 1000 (100–100 000) | 5000 (1000–100 000) | = 0,021 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 100 (10–100) | 55 000 (7500–2 550 000) | = 0,023 |
| <i>S. hominis</i> | 5505 (100–11 000) | 750 000 (500 000–1 000 000) | = 0,029 |
| <i>S. cohnii</i> | 10 000 (10 000–10 000) | 0 | |
| <i>S. capitis</i> | 0 | 1000 (1000–1000) | |
| <i>S. xylosum</i> | 2 500 150 (300–5 000 000) | 10 000 (10 000–10 000) | |

штаммов таких видов как *S. capitis* и *S. hyicus* не обнаружено. По современным данным возрастание численности коагулазонегативных стафилококков также может быть причиной осложнения различных заболеваний, этиологическими факторами которых не всегда являются бактериальные агенты [6].

Повышение концентрации условно-патогенных бактерий говорит о снижении как неспецифического иммунитета, так и общей иммунной резистентности организма, что документируется наличием отрицательных корреляционных взаимосвязей между представителями условно-патогенной микрофлоры и клеточным и гуморальным звеньями иммунной системы. В группе ПРС обнаружены положительные корреляции Т-клеточного и отрицательные В-клеточного звена иммунитета с бактериями рода *Neisseria*. Так, при увеличении уровня В-лимфоцитов у больных в исследуемой группе снижается количество грамотрицательных кокков, входящих в состав нормофлоры. При этом концентрация иммуноглобулина IgG, ЦИК и показателя относительного уровня синтеза IgA возрастает при увеличении концентрации золотистого и гемолитического стафилококков, что является вполне логичным и доказывает их роль в антибактериальной защите. Концентрации IL-6, IL-8, IL-1 β в сыворотке крови и назальном секрете возрастают при увеличении концентрации золотистого, эпидермального и гемолитического стафилококков. Также обнаружена отрицательная корреляция между уровнем выработки активных форм кислорода нейтрофильными гранулоцитами и количе-

ственным составом микроорганизмов, относящихся к грамположительной микрофлоре (стрептококки и стафилококки).

Подводя итоги, можно сказать, что при полипозном риносинусите на слизистой оболочке носа имеет место выраженный дисбиоз. Полученные результаты работы расценены нами как явления нарушения микробиоценоза, наступившего вследствие снижения местного и системного иммунитета из-за трофических расстройств слизистой оболочки носовых ходов. Микробный пейзаж слизистой оболочки носа беднее, чем зева, поэтому любые, даже минимальные отклонения могут быть индикаторами дисбиотических нарушений.

При изучении микрофлоры, полученной со слизистой оболочки носа, было выявлено 407 культур микроорганизмов при ПРС. В группе контроля выявлено 174 культуры микроорганизмов. Среди изолятов установлено 6 родов 9 видов бактерий при ПРС против 6 родов и 8 видов в группе контроля.

Анализ частоты встречаемости микроорганизмов, принадлежащих к разным родам, показал, что в группе ПРС чаще всего, по сравнению с группой контроля, выделялись бактерии рода *Streptococcus* и семейства *Neisseria*. Анализ процентного состава бактерий в группе больных ПРС обнаружил достоверно высокую частоту встречаемости таких микроорганизмов как *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *M. catarrhalis*, относительно контроля (табл. 2).

Среди бактерий, относящихся к роду *Staphylococcus*, выделенных со слизистой оболочки носа, в группе ПРС отмечен более высокий процент

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ БАКТЕРИЙ НА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ НОСА У БОЛЬНЫХ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ

| Показатели, % | Me (C ₂₅ -C ₇₅) | | |
|--------------------------------|--|-------------|---------|
| | Контроль, n = 156 | ПРС, n = 58 | P |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 35,76 | 54,10 | < 0,001 |
| <i>Streptococcus</i> spp. | 34,12 | 73,77 | < 0,001 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> spp. | 27,06 | 52,46 | < 0,001 |
| <i>Micrococcus</i> spp. | 14,71 | 57,38 | < 0,001 |
| <i>Neisseria</i> spp. | 12,94 | 68,57 | < 0,001 |
| <i>S. pneumoniae</i> | 13,5 | 47,54 | < 0,001 |
| <i>S. pyogenes</i> | 0 | 49,18 | < 0,001 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 16,47 | 55,74 | < 0,001 |
| <i>S. aureus</i> | 14,71 | 54,10 | < 0,001 |
| <i>S. epidermidis</i> | 33,53 | 55,74 | < 0,001 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 17,62 | 52,46 | < 0,001 |
| <i>S. hominis</i> | 11,81 | 55,74 | < 0,001 |
| <i>S. cohnii</i> | 29,01 | 0 | |
| <i>S. capitis</i> | 0 | 50,82 | < 0,001 |
| <i>S. xylosum</i> | 11,81 | 67,21 | < 0,001 |

обнаружения как коагулазоположительных стафилококков, к которым относится золотистый стафилококк, так и коагулазоотрицательных, таких как *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* и *S. xylosus* по сравнению с контролем.

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

Ведется поиск информативных биологических характеристик микроорганизмов, определяющих их длительное персистирование в организме человека. В этом плане перспективным представляется подход, основанный на регистрации и анализе у изолируемых штаммов комплекса биологических свойств, направленных на инактивацию факторов естественной противoinфекционной защиты макроорганизма и обозначаемые как маркеры бактериальной персистенции. К факторам патогенности стафилококков относят продуцируемые ими ферменты и токсины [14, 15]. В работе были изучены такие биохимические свойства, как гемолитическая, лецитиназная, липазная, фибринолитическая активность и способность продуцировать коллагеназу. При изучении способности продуцировать ферменты патогенности среди стафилококков в группе больных ПРС и контрольной группе получены следующие результаты: коагулазоположительных штаммов обнаружено 22,8% при ПРС и 20% в контрольной группе; гемолитическую активность проявляли 30% стафилококков при ПРС, в контроле — 12%. При этом диаметр зоны лизиса эритроцитов в группе ПРС — $8,0 \pm 0,7$ мм и в группе контроля — $3,4 \pm 0,4$ мм. Лецитиназная активность была отмечена у 27,5% стафилококков при ПРС, в контрольной группе — 18%. Диаметр зоны действия фермента лецитиназы при ПРС — $2,3 \pm 1,6$ мм и в группе контроля $1,4 \pm 0,1$ мм. Фермент липаза присутствовал у 28% штаммов стафилококков при ПРС и 15% в контроле. Диаметр зоны липазной активности в группах больных ПРС и контроля составил соответственно $4,7 \pm 0,9$ и $2,4 \pm 0,2$ мм. При изучении фибринолитической активности в группе ПРС 60% штаммов золотистого стафилококка

продуцировали данный фермент (коагулазоотрицательные виды стафилококков такой способностью не обладали) в контрольной группе количество штаммов способных продуцировать фибрин соответствовало 9%. Высокую протеолитическую активность при ПРС проявили стафилококки (46,6%) при этом в контрольной группе процент стафилококков способных разжижать желатину соответствовал 27%.

Критериями персистенции служат частота хронизации инфекционного процесса или формирование бактерионосительства. Биологические свойства микроорганизмов, обеспечивающих длительное сохранение патогена в организме хозяина, обозначают как факторы персистенции, которые обеспечивают, в частности стафилококкам, устойчивость к бактерицидным системам хозяина [8]. Изучение персистентных свойств стафилококков, выделенных со слизистой оболочки носа при ПРС, показало, что антилизоцимная активность присутствовала у 36% штаммов бактерий рода *Staphylococcus*, диаметр зоны лизиса при этом соответствовал $9,8 \pm 1,6$ мм. Количество штаммов, обладающих антиинтерфероновой активностью, соответствовало 50%. Диаметр зоны просветления составил $7,5 \pm 0,7$ мм. В контрольной группе выделенные стафилококки не обладали антиинтерфероновой и антилизоцимной активностью. В группе ПРС наблюдалась положительная взаимосвязь между плазмокоагулазной, лецитиназной и липазной активностью ($r = 0,61$, $P < 0,001$; $r = 0,35$, $P < 0,001$) и антилизоцимной активностью стафилококков ($r = 0,41$, $P < 0,001$). При этом наблюдалась отрицательная взаимосвязь между способностью разрушать эритроциты и липазной активностью ($r = -0,31$, $P = 0,030$) а также прямая зависимость с протеолитической активностью ($r = 0,49$, $P < 0,001$). Лецитиназная активность положительно взаимосвязана с липазой и антилизоцимной активностью ($r = 0,59$, $P < 0,001$; $r = 0,29$, $P = 0,014$).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки, выделенные в группе ПРС, проявляют агрессивные свойства, продуцируя ферменты, которые расцениваются как факторы патогенности. Это может свидетельствовать об их роли в развитии воспалительного процесса на слизистой оболочке носа. Активизация аутофлоры происходит при разнообразных повреждающих воздействиях на организм человека, но снижение антимикробной резистентности является не единственной причиной развития эндогенной инфекции. Угнетение факторов естественного иммунитета вызывает глубокие нарушения сложившихся ассоциативных связей в микробиоценозах, что, в конечном счете,

приводит к дисбактериозам и изменению биологических свойств микробов аутофлоры. О нарушениях, происходящих на этапах развития дисбиозов, можно судить по однотипным реакциям, которые возникают при воздействии различных патологических агентов. Согласно данным литературы, сначала наблюдается значительное количественное увеличение нормальных симбионтов. Следствием возрастания количества микроорганизмов является усиление процессов конкуренции и интерференции между ними, что приводит в последующем к исчезновению некоторых симбионтов [2, 13]. Так, в группе больных ПРС наблюдается высокая обсемененность золотистым стафилококком при снижении частоты обнаружения или отсутствия некоторых других представителей. Подобная экологическая ситуация свидетельствует о формировании дисбиоза, когда один или несколько видов бактерий занимают доминирующее положение в микробном пейзаже носа, а нормальная микрофлора подавляет-

ся. Золотистый стафилококк часто сочетается со стрептококками и пневмококками, являясь обычно выражением смешанной инфекции. Полученные нами положительные корреляционные взаимосвязи между этими представителями это подтверждают [14].

Формирование новых микробных сообществ может изменять среду обитания и характер взаимоотношений между ассоциантами. Многие исследователи считают, что в таких условиях происходит отбор микропопуляций аутофлоры с повышенными вирулентными свойствами [1, 5, 8].

Проведенный анализ выявил особенности биологических свойств стафилококков, определяющих клиническое течение заболевания: стафилококки, длительно вегетирующие на слизистой оболочке носа изменяют свои свойства в сторону повышения устойчивости к факторам естественной резистентности, что, вероятно, сообщает им дополнительные селективные преимущества при развитии воспалительного процесса.

Список литературы/References

1. Батуро А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А. Доминирование *Staphylococcus aureus* в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 1. С. 72–74. [Baturo A.P., Romanenko E.E., Leonova A.Yu., Yartseva A.S., Savlevich E.L., Mokronosova M.A. Domination of *Staphylococcus aureus* in microbiocenosis of nasal cavity in children and adults with infectious and allergic rhinitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 1, pp. 72–74. (In Russ.)]
2. Бондарев Г.П., Терехова А.О. Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой // Вестник оториноларингологии. 2010. № 3. С. 9–11. [Bondarev G.P., Terekhova A.O. The role of infection in the development of polypous rhinosinusitis in patients with bronchial asthma. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2010, no. 3, pp. 9–11. (In Russ.)]
3. Варвянская А.В., Лопатин А.С. Эффективность длительной терапии низкими дозами макролидов при полипозном риносинусите // Вестник оториноларингологии. 2013. № 5. С. 22–27. [Varvianskaia A.V., Lopatin A.S. The effectiveness of long-term treatment of polypous rhinosinusitis with low doses of macrolides. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2013, no. 5, pp. 22–27. (In Russ.)]
4. Долгов В.А. Сравнительная характеристика видового состава микрофлоры барабанной полости, слизистой оболочки носа и наружного уха в процессе экспериментального стафилококкового гнойного среднего отита // Вестник оториноларингологии. 2014. № 5. С. 34–36. [Dolgov V.A. The comparative characteristic of the microflora species composition in the tympanic cavity, nasal mucous membrane and external ear mucosa in the course of experimental suppurative staphylococcal otitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2014, no. 5, pp. 34–36. (In Russ.)]
5. Иванова М.А., Пискунов Г.З. Сравнительная характеристика микрофлоры полости носа и околоносовых пазух у пациентов с рецидивирующими воспалительными заболеваниями // Российская ринология. 2007. № 3. С. 18–21. [Ivanova M.A., Piskunov G.Z. The comparative characteristic of infection of a nose and paranasal sinuses in patients with recurrent inflammatory diseases. *Rossiiskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2007, no. 3, pp. 18–21. (In Russ.)]
6. Коленчукова О.А., Акчешбаев С.В., Капустина Т.А., Парилова О.В., Кин Т.И. Сравнительная характеристика стафилококкового пейзажа слизистой оболочки носа при синусите и рините // Вестник оториноларингологии. 2009. № 2. С. 7–9. [Kolenchukova O.A., Akcheshbaev S.V., Kapustina T.A., Parilova O.V., Kin T.I. Comparative characteristics of the staphylococcus landscape of nasal mucosa in patients with sinusitis and rhinitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2009, no. 2, pp. 7–9. (In Russ.)]
7. Мавзютов А.Р., Мавзютова Г.А., Бондаренко К.Р., Сендерович С.Е., Назмутдинова Р.Г., Мурзабаева Р.Т., Кузовкина О.С., Акбашева А.О., Дубровская Д.Н. Характер изменений уровня липополисахарид-связывающего белка при различных инфекционных процессах и дисбиозах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 2. С. 66–72. [Mavziutov A.R., Mavziutova G.A., Bondarenko K.R., Senderovich S.E., Nazmutdinova R.G., Murzabaeva R.T., Kuzovkina O.S., Akbasheva A.O., Dubrovskaja D.N. Character of lipopolysaccharide-binding protein level changes in different pathological conditions and dysbiosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 2, pp. 66–72. (In Russ.)]
8. Мельников В.Г. К вопросу о болезнетворности условно-патогенных микроорганизмов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 3. С. 15–18. [Melnikov V.G. On pathogenicity of opportunistic pathogens. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2010, no. 3, pp. 15–18. (In Russ.)]

9. Пашченков М.В., Попилук С.Ф., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Феденко Е.С., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунологические свойства мурамилпептидных фрагментов пептидогликана грамотрицательных бактерий // Иммунология. 2010. № 3. С. 119–125. Pashchenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Fedenko E.S., Khaitov R.M., Pinegin B.V. Immunobiological properties of muramylpeptide fragments of peptidoglycan from Gram-negative bacteria. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 3, pp. 119–125. (In Russ.)
10. Саидов М.З., Давудов Х.Ш., Магомедов И.М., Климова С.В., Будихина А.С., Назмутдинов И.И. Особенности состояния и взаимосвязи показателей системного и местного адаптивного иммунитета при полипозном риносинусите // Иммунология. 2010. № 6. С. 365–369. [Saidov M.Z., Davudov Kh.Sh., Magomedov I.M., Klimova S.V., Budikhina A.S., Nazhmudinov I.I. The informative value of correlation relationships between characteristics of congenital and adaptive immunity in frequently ill children presenting with adenotonsillar hypertrophy. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 6, pp. 365–369. (In Russ.)]
11. Трофименко С.Л. Патогенез и клиника полипозного риносинусита // Вестник оториноларингологии. 2010. № 4. С. 94–97. [Trofimenko S.L. Pathogenesis and clinical features of polypous rhinosinusitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2010, no. 4, pp. 94–97. (In Russ.)]
12. Цывкина А.А., Царев С.В. Полипозный риносинусит в рамках астматической триады // Вестник оториноларингологии. 2011. № 1. С. 77–80. [Tsyvkina A.A., Tsarev S.V. Polypous rhinosinusitis in the context of the asthma triad. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2011, no. 1, pp. 77–80. (In Russ.)]
13. Haddadin R.N., Saleh S.A., Ayyash M.A., Collier P.J. Occupational exposure of pharmaceutical workers to drug actives and excipients and their effect on *Staphylococcus* spp. nasal carriage and antibiotic resistance. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 2013, vol. 19, no. 3, pp. 207–214. doi: 10.1179/2049396713Y.0000000035
14. Huvenne W., Hellings P.W., Bachert C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013, vol. 161, no. 4, pp. 304–314. doi: 10.1159/000350329
15. Johannessen M., Sollid J.E., Hanssen A.M. Host- and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012, no. 4, pp. 2–56. doi: 10.3389/fcimb.2012.00056
16. Seiberling K.A., Conley D.B., Tripathi A., Grammer L.C., Shuh L., Haines G.K. 3rd, Schleimer R., Kern R.C. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope*, 2005, vol. 115, no. 9, pp. 1580–1585.

Авторы:

Коленчукова О.А., д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Смирнова С.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Лаптева А.М., аспирант очной формы обучения ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director on Science, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Lapteva A.M., PhD Candidate, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.07.2015
Отправлена на доработку 20.11.2015
Принята к печати 01.08.2016

Received 30.07.2015
Revision received 20.11.2015
Accepted 01.08.2016

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ ТЯЖЕЛЫХ ТРАВМ

С.А. Свистунов, А.А. Кузин, Т.Н. Суборова, Д.А. Жарков

ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Минобороны России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Современной проблемой клинической медицины и в большей степени хирургии являются инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. За последнее время в хирургии достигнут значительный прогресс, связанный с новыми организационными подходами и медицинскими технологиями специализированной медицинской помощи раненым и пострадавшим. Однако эти достижения нивелируются высокой частотой инфекционных осложнений, требующих поиска эффективных мер диагностики и профилактики. У пациентов с тяжелыми травмами часто развиваются внутрибольничные инфекции, что во многом определяется влиянием клинико-патогенетических факторов риска. Такие инфекционные осложнения требуют всесторонней оценки, в том числе с проведением микробиологических исследований. Основными возбудителями инфекционных осложнений в хирургических стационарах являются *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., которые способны вызывать инфекции кровотока, мягких тканей, дыхательных и мочевыводящих путей, особенно у ослабленных и иммунокомпрометированных пациентов, а также пациентов, находящихся в отделениях интенсивной терапии. Эти микроорганизмы представляют угрозу для пациентов и медицинского персонала, поскольку способны длительно сохраняться в больничной среде, а также распространяться от пациента к пациенту при нарушении изоляционно-ограничительных мероприятий и требований к гигиене рук медицинских работников. Клинические закономерности развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи при тяжелых травмах, заключаются в возможности последовательного и параллельного развития как в разные, так и в одинаковые сроки местных, висцеральных и генерализованных инфекционных осложнений с преобладанием сочетанных форм у пациентов хирургического стационара с высоким риском внутрибольничного инфицирования на фоне действия факторов лечебно-диагностического процесса и госпитальной среды, заноса возбудителей. Ранняя постановка этиологического диагноза позволяет своевременно назначить эмпирическую этиотропную терапию и провести мероприятия инфекционного контроля, направленные на предотвращение распространения микроорганизмов в стационаре. Использование хромогенных (флюорогенных) сред при исследовании проб клинического материала на этапе первичного посева делает возможным получение ускоренного ответа (через 18–24 ч). Микробиологический мониторинг в диагностике инфекционных осложнений у пациентов с тяжелыми травмами и эпидемиологическом надзоре за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи позволяет выявлять возбудителей, способных становиться ведущими патогенами, образовывать

Адрес для переписки:

Свистунов Сергей Александрович
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6,
Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
кафедра общей и военной эпидемиологии.
Тел.: 8 961 801-57-17. Тел./факс: (812) 292-34-20.
E-mail: svistunoww@rambler.ru

Contacts:

Sergey A. Svistunov
194044, Russian Federation, St. Petersburg,
Akademika Lebedeva str., 6,
Military Medical Academy named after S.M. Kirov,
Department of Epidemiology.
Phone: +7 961 801-57-17. Phone/fax: +7 (812) 292-34-20.
E-mail: svistunoww@rambler.ru

Библиографическое описание:

Свистунов С.А., Кузин А.А., Суборова Т.Н., Жарков Д.А. Опыт применения микробиологических методов исследований при инфекционных осложнениях тяжелых травм // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 373–378. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-373-378

Citation:

Svistunov S.A., Kuzin A.A., Suborova T.N., Zharkov D.A. Microbiological methods application experience in the severe injuries infectious complications // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 373–378. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-373-378

устойчивые внутри- и межгрупповые ассоциации и изменять характер инфицирования по типу персистенции, суперинфекции и реинфекции, а также особенности многолетних и внутригодовых изменений частоты выделения патогенов.

Ключевые слова: микробиологическая диагностика и мониторинг, инфекционные осложнения, раненые и пострадавшие, хирургический стационар, ассоциации возбудителей, хромогенные среды.

MICROBIOLOGICAL METHODS APPLICATION EXPERIENCE IN THE SEVERE INJURIES INFECTIOUS COMPLICATIONS

Svistunov S.A., Kuzin A.A., Suborova T.N., Zharkov D.A.

Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Modern clinical medicine and surgery problems are associated with infections complications after medical care. In recent years, surgery has made substantial progress related to the new organizational approaches and medical technology specialized medical care to the wounded and injured. However, these gains are offset by a high rate of infectious complications that require finding effective measures emerging infectious complications timely diagnosis and their prevention. Clinical manifestations are often nosocomial in patients with severe injuries and are largely determined by the influence of clinical and pathogenetic risk factors. Such infectious complications require a comprehensive assessment, including microbiological testing. The main causative agents of infectious complications in surgical hospitals are *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., which can cause bloodstream infections, soft tissue, respiratory and urinary tract infections, especially in debilitated and immunocompromised patients and patients in intensive care units. These microorganisms are dangerous to patients and medical staff, as they can survive for a long time in the hospital environment, as well as to spread from patient to patient in violation of isolation restrictive measures and requirements for hygiene of medical workers hands. Clinical patterns of infection associated with medical care for severe injuries are to the possibility of serial and parallel development, both in different and in the same time frame of local, visceral and generalized infection with prevalence of combined forms of patients surgical hospital with a high risk of nosocomial infection against the background of factors, diagnostic and treatment process and hospital environment, introduction of the agent. Early etiological diagnosis allows timely assign empirical causal treatment and arrange for infection control to prevent the spread of microorganisms in the hospital. The use of chromogenic (fluorogenic) environments in the study samples of clinical material at the stage of primary seeding makes it possible to obtain rapid response (18–24 h). Microbiological monitoring in the diagnosis of infectious complications in patients with severe injuries and epidemiological surveillance for infections associated with medical care can detect agents capable of becoming the leading pathogens, form stable intra and intergroup associations and change the nature of the infection on persistence type superinfection and reinfection, as well as the features of the multiyear and intrachange frequency allocation pathogens.

Key words: microbiological diagnosis and monitoring, infectious complications, wounded and injured, surgical hospital, agents association, chromogenic medium.

Введение

Одной из актуальных проблем современного здравоохранения является профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [2]. Несмотря на проводимую работу в данном направлении сохраняются предпосылки для возникновения ИСМП, что может быть связано с созданием крупных больничных комплексов; наличием в стационарах большого числа источников инфекции; возрастанием роли искусственного и активизацией естественных механизмов передачи инфекции; нерациональным применением антибиотиков; увеличением групп риска (пожилые люди, больные с хроническими заболеваниями) и др. [4, 6, 9, 12, 13]. Неотъемлемой частью организации профилактики ИСМП является микробиологический мониторинг, позволяющий следить за циркуля-

цией возбудителей в стационаре, динамикой их структуры и биологических свойств, тенденциями развития устойчивости к антимикробным препаратам (АМП) [5, 7, 10, 11]. Проведение микробиологических исследований в медицинских организациях регламентировано СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность». Однако бактериологические лаборатории имеются в штате не всех медицинских организаций. Количество и объем проводимых ими исследований весьма ограничены, что связано с неуккомплектованностью специалистами, нехваткой реактивов и оборудования, а также несоответствием штата лаборатории объему возложенных задач [1]. При этом мероприятия производственного контроля часто сведены только к контролю стерильности медицинского инструментария [8]. Единичные слу-

чаи регистрации ИСМП в стационарах связаны не с систематическим активным выявлением больных, а по большей части с возникновением нештатных ситуаций [3].

Материалы и методы

В ходе работы проводили исследование проб клинического материала, полученных от пациентов специализированного стационара по лечению тяжелых ранений и травм. Взятие материала и транспортировку в лабораторию осуществляли в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ 23 декабря 2005 г. Организация микробиологических исследований соответствовала требованиям руководства по санитарной микробиологии (2006) и методических рекомендаций по микробиологической диагностике раневых инфекций в лечебно-диагностических учреждениях армии и флота (1999). Отбор образцов клинического материала для бактериологического исследования проводили при строгом соблюдении правил асептики в соответствии с нормативными документами. Для получения предварительных (ускоренных) результатов идентификации дополнительно производили посевы на хромогенные среды «Uriselect 4» (Bio-Rad, Франция) и «Хай Хром селективный агар для грибов Candida» (HiMedia, Индия).

Результаты и обсуждение

Установлено, что лечение раненых и пострадавших с тяжелыми травмами, а также пациентов с тяжелой хирургической патологией характеризуется этапностью, что предполагает их перемещение внутри разных подразделений стационара и влияет на частоту их бактериологического обследования. Наиболее часто эти исследования в рамках микробиологического мониторинга проводились пациентам отделения интенсивной терапии (ОИТ), в других подразделениях они назначались лечащими врачами при подозрении на инфекционное осложнение или для оценки эффективности анти-

бактериальной терапии. Основным принципом формирования системы микробиологического мониторинга является зависимость объема бактериологических исследований от тяжести и распространенности инфекционного процесса, при этом уровень сопровождения определяется клиническим диагнозом у конкретного пациента.

Общее число обследованных составило 1296 человек, у 1087 (83,9%) из них были обнаружены возбудители ИСМП во время лечения в разных отделениях. При этом у 126 (11,6%) человек была отмечена смена возбудителя. Более 70,0% пациентов лечились в отделениях интенсивной терапии (всего 907 человек). Доля пациентов ОИТ, у которых в клиническом материале были выделены госпитальные микроорганизмы, составила 71,4% (раненые и пострадавшие с тяжелыми травмами — 64,4%), что свидетельствует о существенной пораженности ИСМП данной категории пациентов. По результатам проведенного исследования частота выделения возбудителей у пациентов с тяжелыми травмами в несколько раз превышала показатель для пациентов хирургического профиля, однако в отделении раневой инфекции и специализированных хирургических отделениях это соотношение было незначительным. Установлено, что микробный пейзаж отделений формировался преимущественно возбудителями, выделенными от пациентов с развившимися инфекционными осложнениями. Ведущими возбудителями, которые доминировали в микробном пейзаже были *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *S. aureus*. Данные возбудители преобладали в спектре выделенных микроорганизмов, при этом их совокупная доля у лиц с ИОХВ составила 63%, ИДП — 72%, ИМВП — 30%, при бактериемии — 54,4% (табл. 1).

В ходе проведения исследования так же было установлено, что в 21,8% случаев ИСМП имели полимикробную этиологию. Данные о составе наиболее часто выделяемых микробных ассоциаций представлены в таблице 2. Чаще всего выделялись ассоциации *K. pneumoniae* с *Enterococcus* spp. (41,9%), *K. pneumoniae* с *Acinetobacter* spp. (32,3%), *Candida* spp. с *Enterococcus* spp. (32,3%), реже *P. aeruginosa* с *Enterococcus* spp. и *P. aeru-*

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВЫДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОМ СТАЦИОНАРЕ С УЧЕТОМ ИХ ПОВТОРНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ

| Возбудители | ИОХВ | ИДП | ИМВП | Бактериемия |
|------------------------------|------|-----|------|-------------|
| <i>S. aureus</i> , % | 19 | 16 | 1 | 37 |
| <i>P. aeruginosa</i> , % | 14 | 18 | 10 | — |
| <i>K. pneumoniae</i> , % | 15 | 18 | 13 | 13 |
| <i>Acinetobacter</i> spp., % | 15 | 20 | 7 | 5 |
| Прочие, % | 37 | 28 | 70 | 45,6 |

ТАБЛИЦА 2. ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПОСТРАДАВШИХ С ТЯЖЕЛЫМИ ТРАВМАМИ

| Ассоциации возбудителей | Частота выделения, % |
|--|----------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> + <i>Enterococcus</i> spp. | 41,9 |
| <i>Acinetobacter</i> spp. + <i>K. pneumoniae</i> | 32,3 |
| <i>Candida</i> spp. + <i>Enterococcus</i> spp. | 32,3 |
| <i>P. aeruginosa</i> + <i>Enterococcus</i> spp. | 29,0 |
| <i>Acinetobacter</i> spp. + <i>P. aeruginosa</i> | 29,0 |
| <i>Acinetobacter</i> spp. + <i>S. aureus</i> | 25,8 |
| <i>S. aureus</i> + <i>Enterococcus</i> spp. | 25,8 |
| <i>K. pneumoniae</i> + <i>P. aeruginosa</i> | 19,4 |

giosa с *Acinetobacter* spp. (29,0%), а также ассоциации *S. aureus* с *Enterococcus* spp. (25,8%), *S. aureus* с *Acinetobacter* spp. (25,8%) и *K. pneumoniae* с *P. aeruginosa* (19,4%) (табл. 2).

Основные возбудители ИСМП также различались по частоте выявления в зависимости от характера клинического материала. Так, было установлено, что в отделяемом нижних дыхательных путей чаще обнаруживаются *Acinetobacter* spp. (16,7%) и *P. aeruginosa* (16,7%), в моче — *Candida* spp. (19,9%) и *Enterococcus* spp. (14,7%), в отделяемом верхних дыхательных путей — *Acinetobacter* spp. (19%) и *K. pneumoniae* (19%), в крови чаще обнаруживался *S. aureus* (8,3%), в ликворе — *Enterococcus* spp. (15,8%), в раневом отделяемом и синовиальной жидкости — *S. aureus* (14,1 и 25% соответственно). Кроме этого в микробном пейзаже выделены и другие микроорганизмы, частота выделения которых зависела от профиля отделения.

Для первичного посева проб клинического материала дополнительно использовали хромогенный неселективный агар «Uriselect 4» (Bio-Rad, Франция) и «Хай Хром селективный агар для грибов *Candida*» (HiMedia, Индия), позволяющие проводить одноэтапное выделение и идентификацию наиболее распространен-

ных возбудителей: *Staphylococcus* spp. (включая *S. aureus*), энтеробактерии (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. и др.), неферментирующие грамотрицательные бактерии (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), *Enterococcus* spp., *Candida* spp. и др. Несмотря на то, что подобные среды разрабатывались, прежде всего, для исследования проб мочи, во многих лабораториях в настоящее время их все шире используют для посева другого клинического материала. Анализ результатов посева проб клинического материала показал, что в 53,6% проб микроорганизмы присутствуют в монокультуре, а в 46,4% проб — в ассоциации. При этом монокультуры были выделены из 95,7% проб крови, 29,2% проб отделяемого нижних дыхательных путей и 58,9% мочи, 60,3% проб раневого отделяемого. Использование для первичного посева хромогенной среды позволило уже через 24 ч не только выделить чистую культуру возбудителей, но и определить видовой состав микробных ассоциаций. Они состояли из 2–4 различных видов возбудителей, колонии которых четко дифференцировались на хромогенной среде. Чаще встречались пробы, содержащие два вида возбудителей (26,3% проб), в 13,9% проб ассоциации включали три вида, в 6,2% проб — четыре вида (табл. 3.).

Необходимо отметить, что проведение микробиологического мониторинга подразумевает решение ряда важных задач, что позволяет обобщать меры профилактики ИСМП. К их числу относятся:

- этиологическая расшифровка инфекционных осложнений у пациентов, выявление госпитальных штаммов микроорганизмов и разработка стратегии и тактики борьбы с ними;
- динамическая оценка и корректировка проводимой антимикробной терапии на основе организации рационального взаимодействия между лечащими врачами и сотрудниками микробиологической лаборатории;

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМОГЕННОЙ СРЕДЫ «URISELECT 4»

| Клинический материал | Пробы с наличием роста микроорганизмов | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--|------|----------------------------|------|--------|------|--------|------|-------|------|-------|-----|
| | Монокультура | | Ассоциации микроорганизмов | | | | | | | | Всего | |
| | | | 2 вида | | 3 вида | | 4 вида | | всего | | | |
| | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| Отделяемое дыхательных путей | 57 | 29,2 | 69 | 35,4 | 42 | 21,5 | 27 | 13,8 | 138 | 70,8 | 195 | 100 |
| Моча | 146 | 58,9 | 66 | 26,6 | 27 | 10,9 | 9 | 3,6 | 102 | 41,1 | 248 | 100 |
| Раневое отделяемое | 178 | 60,3 | 68 | 23,1 | 39 | 13,2 | 10 | 3,4 | 117 | 39,7 | 295 | 100 |
| Кровь | 22 | 95,7 | 1 | 4,3 | | 0,0 | | 0,0 | 1 | 4,3 | 23 | 100 |
| Другой материал | 19 | 73,1 | 3 | 11,5 | 1 | 3,8 | 3 | 11,5 | 7 | 26,9 | 26 | 100 |
| Итого | 422 | 53,6 | 207 | 26,3 | 109 | 13,9 | 49 | 6,2 | 365 | 46,4 | 787 | 100 |

– выявление носителей возбудителей ИСМП и факторов передачи возбудителя в ходе лечебно-диагностического процесса, микробиологическая оценка качества проводимых санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий на основе организации взаимодействия между госпитальными эпидемиологами и сотрудниками микробиологической лаборатории;

– своевременная коррекция лекарственного формуляра на основе организации взаимодействия между клиническими фармакологами и сотрудниками микробиологической лаборатории;

– раннее активное выявление пациентов, подвергшихся риску инфицирования и заболевания ИСМП.

Выводы

Микробиологический мониторинг составляет основу этиологической диагностики инфекционных осложнений и является важнейшим инструментом эпидемиологического надзора за ИСМП, позволяющим определять «проблемные» микроорганизмы и своевременно обосновывать направления совершенствования лечебно-

профилактических мероприятий. Для расшифровки этиологии ИСМП необходимо проводить микробиологическое исследование полученного от пациента клинического материала с идентификацией выделенных микроорганизмов и их внутривидовой дифференциацией, а также определение спектра чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам.

Использование хромогенных сред с дополнительными селективными добавками при посевах клинического материала позволяет в один этап проводить не только выделение и идентификацию микроорганизма, но и (в зависимости от селективной добавки) обнаружить штаммы, устойчивые к бета-лактамам (MRSA, БЛРС-продуцирующие и карбапенем-резистентные энтеробактерии и ГОНБ) и гликопептидам (VRE). При этом срок исследования сокращается до 18–24 ч. Кроме того, такие среды позволяют заметить «гетерогенность» популяции возбудителя по чувствительности к антимикробным препаратам, и выявить те колонии, которые характеризуются устойчивостью. Создание базы данных штаммов, полученных в микробиологической лаборатории, обеспечит проведение полноценного эпидемиологического анализа.

Список литературы/References

1. Акимкин В.Г., Азаров И.И., Волынков И.О., Бобылев В.А. Основные направления деятельности специалистов медико-профилактического профиля в военных госпиталях // Военно-медицинский журнал. 2015. Т. 336, № 9. С. 11–16. [Akimkin V.G., Azarov I.I., Volynkov I.O., Bobylev V.A. The main directions of activity of specialists of medical and preventive profile in military hospitals. *Voенно-медицинский журнал = Military Medical Journal*, 2015, vol. 336, no. 9, pp. 11–16. (In Russ.)]
2. Брико Н.И. Госпитальная эпидемиология: реальность и перспективы // Поликлиника. 2014. № 3. С. 11–17. [Briko N.I. Hospital epidemiology: reality and perspectives. *Poliklinika = Polyclinic*, 2014, no. 3, pp. 11–17. (In Russ.)]
3. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ефимов Г.Е., Ковалишена О.В., Стасенко В.Л., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В. Эпидемиологическая безопасность важнейшая составляющая обеспечения качества и безопасности медицинской помощи // Вестник Росздравнадзора. 2014. № 3. С. 27–32. [Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Efimov G.E., Kovalishena O.V., Stasenko V.L., Feldblum I.V., Shkarin V.V. Epidemiological safety is the key component for ensuring quality and safety of medical care. *Vestnik Roszdravnadzora = Herald of Roszdravnadzor*, 2014, no. 3, pp. 27–32. (In Russ.)]
4. Габриэлян Н.И., Савостьянова О.А., Горская Е.М., Батыршина Л.Р., Ромашкина Л.Ю., Попцов В.Н., Акимкин В.Г. Эпидемиологическая и микробиологическая характеристика послеоперационного периода у пациентов старшего возраста в кардиохирургии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 14, № 5 (84). С. 51–56. [Gabrielyan N.I., Savostyanova O.A., Gorskaya E.M., Batirchina L.R., Romashkina L.Yu., Poptsov V.N., Akimkin V.G. The epidemiological and microbiological characteristics of the postoperative period in older patients in cardiac surgery. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, vol. 14, no. 5 (84), pp. 51–56. (In Russ.)]
5. Гусаров В.Г., Нестерова Е.В., Лашенкова Н.Н., Петрова Н.В., Силаева Н.А., Тертицкая А.Б., Теплых Б.А., Гороховатский Ю.И., Замятин М.Н. Изменение антибиотикорезистентности нозокомиальной микрофлоры: результаты внедрения стратегии контроля антимикробной терапии в многопрофильном стационаре // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 5. С. 11–18. [Gusarov V.G., Nesterova E.E., Lashenkova N.N., Petrova N.V., Silaeva N.A., Tertitskaya A.B., Teplykh B.A., Gorokhovatsky Yu.I., Zamyatin M.N. Change of antibiotic-resistant nosocomial microflora: results of implementation of the strategy for control of antimicrobial treatment in multi speciality in-patient hospital. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2015, vol. 20, no. 5, pp. 11–18. (In Russ.)]
6. Дубров В.Э., Колтович А.П., Ханин М.Ю., Палтышев И.А., Ивченко Д.Р., Цвигун О.В., Кобрицов Г.П., Герейханов Ф.Г. Особенности хирургического лечения раненых с комбинированными термомеханическими повреждениями конечностей в условиях контртеррористической операции // Военно-медицинский журнал. 2015. Т. 336, № 11. С. 27–37. [Dubrov V.E., Koltovich A.P., Khanin M.Yu., Paltyshev I.A., Ivchenko D.R., Tsvigun O.V., Kobritsov G.P., Gerejkanov F.G. Especially the surgical treatment of the wounded limb with combined thermomechanical damages in a counter-terrorist operation. *Voенно-медицинский журнал = Military Medical Journal*, 2015, vol. 336, no. 11, pp. 27–37. (In Russ.)]
7. Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Спектр антибиотикорезистентности и распространенности ОХА-карбапенемаз среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов

- хирургических и реанимационных отделений в Москве // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 1. С. 40–45. [Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Mayansky N.A. Spectrum of antibiotic resistance and prevalence of oxa-carbapenemases among acinetobacter baumannii strains, isolated from patients of surgical and reanimation departments in Moscow. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 1, pp. 40–45. (In Russ.)]
8. Кувшинов К.Э., Рыжман Н.Н., Реутский И.А., Буценко С.А. Внутренний контроль качества медицинской помощи в военно-медицинских организациях // Военно-медицинский журнал. 2015. Т. 336, № 2. С. 4–10. [Kuvshinov K.E., Ryzhman N.N., Reutskij I.A., Butsenko S.A. Internal control of the quality of care in military medical institutions. *Voennomeditsinskii zhurnal = Military Medical Journal*, 2015, vol. 336, no. 2, pp. 4–10. (In Russ.)]
 9. Мартынова А.М., Ющенко Г.В. Особенности распространения заболеваний, вызванных *Acinetobacter* spp., в детском многопрофильном стационаре // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015. № 3. С. 11–15. [Martynova A.M., Yushchenko G.V. Specific Features of the spread of diseases caused by *Acinetobacter* spp. at a children's multidisciplinary hospital. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2015, no. 3, pp. 11–15. (In Russ.)]
 10. Чефранова Ж.Ю., Казакова Е.Е., Землянский О.А., Башкирев А.А., Аверина Е.А. Эпидемиологический и микробиологический мониторинг за возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в условиях многопрофильного стационара // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015. № 3. С. 16–20. [Chefranova Zh.Yu., Kazakova E.E., Zemlyansky O.A., Bashkirev A.A., Averina E.A. Epidemiological and Microbiological monitoring of the causative agents of healthcare-associated infections at multidisciplinary hospital. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2015, no. 3, pp. 16–20. (In Russ.)]
 11. CDC. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2014.
 12. Fagan R.P., Edwards J.R., Park B.J., Fridkin S.K., Magill S.S. Incidence trends in pathogen specific central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1990–2010. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2013, vol. 34, no. 9, pp. 893–899. doi: 10.1086/671724
 13. King C., Garcia Alvarez L., Holmes A., Moore L., Galletly T., Aylin P. Risk factors for healthcare-associated urinary tract infection and their applications in surveillance using hospital administrative data: a systematic review. *J. Hosp. Infect.*, 2012, vol. 82, pp. 219–226. doi: 10.1016/j.jhin.2015.05.004

Авторы:

Свистунов С.А., к.м.н., старший преподаватель кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Кузин А.А., д.м.н., доцент, доцент кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Суборова Т.Н., д.б.н., старший научный сотрудник, преподаватель кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Жарков Д.А., преподаватель кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Svistunov S.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Epidemiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;
Kuzin A.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;
Suborova T.N., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Lecturer, Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;
Zharkov D.A., Lecturer, Department of Epidemiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.05.2016
 Принята к печати 06.06.2016

Received 24.05.2016
 Accepted 06.06.2016

ЭТАПНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ ДИАРЕЙ ДЛЯ ВЕРИФИКАЦИИ ДИАГНОЗА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ

Е.А. Кожухова¹, Н.В. Андреева², В.Д. Иващенко¹

¹Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²СПб ФГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. У 264 взрослых больных, госпитализированных с острой диареей в форме средней тяжести, проведено сопоставление клинической симптоматики с результатами выявления энтеропатогенов различными методами диагностики. В период эпидемиологического неблагополучия по дизентерии (2002–2004 гг.) для детекции энтеропатогенов у 91 пациента использовали: культуральный метод (клинический материал — фекалии) и метод выявления специфических сывороточных антител (для детекции *Shigella* spp. и *Salmonella* spp.); метод ИФА (для детекции ротавирусного антигена в фекалиях). В период эпидемиологического благополучия по дизентерии (2009–2011 гг.) исследование клинического материала 173 больных, у которых в симптоматике ОКИ был документирован синдром колита (по результатам копроцитоскопического и/или ректороманоскопического исследования), проводили выше названными методами и дополнительно методом ПЦР (клинический материал — фекалии) набором «Амплисенс® ОКИ скрин-FL» (Интерлабсервис, Россия). Выявили, что у пациентов, у которых в период эпидемиологического неблагополучия по дизентерии обнаруживали только ротавирусный антиген (РВА), и тех, у кого наряду с РВА выявляли *Shigella* spp. культуральным методом, отсутствовали существенные отличия клинически значимых количественных и частотных показателей (в том числе частота наличия синдрома колита). Это позволило предположить возможную гиподиагностику микст-ОКИ при невыявленном использованными методами бактериальном возбудителе. Дополнительное использование ПЦР-метода позволило выявить *Campylobacter* spp. и диагностировать протекавший по типу острой диареи кампилобактериоз, расцененный как основное заболевание и преимущественно в виде моноинфекции — у каждого пятого больного (20,8%), а как сопутствующее при микст-ОКИ — у 4% больных. При наличии в симптоматике синдрома колита использование ПЦР-метода позволило выявить *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. у каждого третьего больного, а *Shigella* spp. и ассоциации энтеропатогенов — у каждого 5-го пациента. Прицельный анализ выявленных энтеропатогенов у обследованных в период эпидемиологического благополучия по дизентерии 15 больных с положительным результатом на ротавирус показал, что у 6 из них (40% пациентов) имела место детекция ассоциации ротавируса с маркерами других, в подавляющем большинстве бактериальных (у 5 из 6 человек), патогенов. Таким образом, у взрослых больных острой диареей с синдромом колита целесообразно комплексное (с включением ПЦР-метода) обследование для расширения возможности детектировать не только вирусные, но и бактериальные способные вызывать колит, энтеропатогены.

Ключевые слова: острая диарея, ассоциация энтеропатогенов, культуральный метод, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.

Адрес для переписки:

Кожухова Елена Алексеевна
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8,
ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.
Тел./факс: 8 (812) 338-70-58, 234-47-98;
8 (905) 221-05-98 (моб.).
E-mail: elko35@gmail.com

Contacts:

Elena A. Kozhukhova
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L'va Tolstogo str., 6/8,
Pavlov First St. Petersburg State Medical University.
Phone/fax: +7 (812) 338-70-58, 234-47-98;
+7 (905) 221-05-98 (mobile).
E-mail: elko35@gmail.com

Библиографическое описание:

Кожухова Е.А., Андреева Н.В., Иващенко В.Д. Этапный анализ результатов выявления возбудителей острых диарей для верификации диагноза у взрослых пациентов // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 379–383. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-379-383

Citation:

Kozhukhova E.A., Andreeva N.V., Ivaschenko V.D. Open ended results of acute diarrhea agent detection to verify diagnosis in adult cases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 379–383. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-379-383

OPEN ENDED RESULTS OF ACUTE DIARRHEA AGENT DETECTION TO VERIFY DIAGNOSIS IN ADULT CASES

Kozhukhova E.A.^a, Andreeva N.V.^b, Ivaschenko V.D.^a

^a Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Hospital named after S.P. Botkin for Infectious Diseases in Adults, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In 264 adult acute diarrhea cases with moderate course it was analyzed both symptoms and agents detected by different methods: in 91 cases (examined in the period of shigellosis high incidence level) — by culture and serologic (specific antibodies detection) methods to detect *Shigella* spp. and *Salmonella* spp. plus ELISA method to detect rotavirus antigen in feces; in 173 cases (examined in the period of shigellosis low incidence level) — by above mentioned methods plus PCR based method. Data obtained in the period of shigellosis high incidence level have shown that there has been no significant difference in clinical scores (including colitis frequency) between cases positive only for rotavirus antigen and those positive both for rotavirus antigen and *Shigella* spp. culture. That let suspect that acute diarrhea had been likely to be caused by association of rotavirus with any bacterial agent undetected by the methods used. PCR-based diagnostic method additionally used (in the period of shigellosis low incidence level) resulted in detection of *Campylobacter* spp. accounted for campylobacteriosis as mono infection in 20,8% cases and as mixed infection (in association with other enteropathogens) — in 4% cases. In cases with colitis the additional usage of PCR-based diagnostic method resulted in *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. detection in every third case, *Shigella* spp. and agent association detection — in every fifth case. The target analysis of enteropathogens detected in 15 cases positive for rotavirus (examined in the period of shigellosis low incidence level) has shown that in 6 of them there has been detected association of rotavirus with other agents predominantly bacterial ones (in 5 of 6 cases). So, the PCR method might be quite useful to broaden the spectrum of detected enteropathogens in adult acute diarrhea cases especially in those with colitis syndrome available.

Key words: acute diarrhea, enteropathogen association, culture method, ELISA method, PCR-based method.

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) остаются серьезной проблемой здравоохранения: они повсеместно распространены, достаточно высококонтагиозны, полиэтиологичны и трудно контролируемы [2]. На фоне развивающихся возможностей лабораторной верификации диагноза все еще весомой остается доля нерасшифрованных ОКИ, имеют место колебания заболеваемости острыми диареями (ОД) различной этиологии, непрогнозируемая смена ведущих сероваров возбудителей, иногда с увеличением частоты тяжелых форм заболевания. Широкое в последнее время использование молекулярно-биологических диагностических методов для детекции возбудителей ОД [4, 6] привело к заметному увеличению частоты регистрации ОКИ вирусной этиологии. Это обстоятельство требует пристального внимания, особенно в случаях, когда в клинической симптоматике у больных документируют проявления, не свойственные вирусным диареям, патогенетически протекающим по типу гастроэнтерита [7, 8]. В этой связи особую значимость приобретает необходимость корректной интерпретации результатов выявления энтеропатогенов, влияющей на тактику ведения больных и на представление о текущей эпидситуации [1, 9].

Цель исследования — сопоставить симптоматику острой диареи у взрослых больных с результатами выявления энтеропатогенов различными используемыми для верификации диагноза методами.

Материалы и методы

С учетом клинической симптоматики анализировали результаты детекции энтеропатогенов у 264 взрослых больных формой средней тяжести ОКИ. В период эпидемиологического неблагополучия по дизентерии (2002–2004 гг.) при использовании культурального метода (с применением сред Плоскирева, Левина, Мюллера, Кауфмана) и метода определения специфических антител в сыворотке крови (с комплексным дизентерийным и сальмонеллезным антигенами), а также иммуноферментного метода (для детекции ротавирусного антигена (РВА) в фекалиях больного), сравнивали клинически значимые показатели отобранных методом случайной выборки 59 больных, у которых удалось обнаружить только РВА, и 32 пациентов, у которых наряду с РВА выявляли рост шигелл (у 71,9% больных — *S. flexneri*, у 21,9% — *S. sonnei*, у 3,1% — ассоциацию *S. flexneri* и *S. sonnei*, у 3,1% — *S. boydii*). В период эпидемиологического благополучия по дизентерии (2009–2011 гг.) анализ результатов выявления энтеропатогенов проводили у 173 больных острой диареей, у которых диагностировали синдром колита. Для детекции возбудителей ОКИ в клиническом материале больных этой группы дополнительно к вышеперечисленным методам использовали метод ПЦР-диагностики набором «Амплиценс® ОКИ скрин-FL» (Интерлабсервис, Россия).

Анализ проводили непараметрическими методами (пакет программ SPSS, 12 версия; пакет

программ SAS) с использованием таблиц сопряженности (для частотных характеристик) и точного критерия Фишера, а также критерия Манна–Уитни для оценки значимости различий медианных значений количественных переменных.

Результаты и обсуждение

Частотные характеристики основных показателей (социальный статус, пол, наличие сопутствующей патологии, симптоматика, реакция лейкоцитов периферической крови) пациентов, у которых в период эпидемиологического неблагополучия по дизентерии обнаруживали только РВА, и тех, у кого наряду с РВА выявляли рост шигелл, не имели значимых отличий. В том числе отсутствовала существенная разница и в частоте диагностики синдрома колита (табл. 1).

При сопоставлении количественных характеристик (длительность лихорадки, патологического стула, день болезни при поступлении, показатели клинического анализа периферической крови, уровень креатинина, тест ЛИИ) разницу получили только в относительном содержании палочкоядерных лейкоцитов [Me (25%,75%): 13,0 (10,0; 16,0)% и 17,0 (12,0; 24,0)%, $p < 0,05$] и эозинофилов [Me (25%,75%): 1,0 (0,0; 2,0)% и 0,0 (0,0; 1,0)%, $p < 0,05$] у больных с позитивной реакцией на РВА и у больных с выявленными и РВА, и шигеллой соответственно. Таким образом, отсутствие в сравниваемых группах заболевших существенных отличий практически по всем клинически значимым показателям позволило предположить у больных, у которых по результатам стандартного комплексного обследования удалось обнаружить только РВА в фекалиях, вероятность микст вирусно-бактериальной инфекции при не выявленном использованными методами бактериальном возбудителе. В соответствии с основными принципами микстинфектологии состояние латенции и персистенции, свойственное облигатным внутриклеточным паразитам (к которым относится большинство энтеропатогенов), — это путь к возникновению ассоциированных состояний с образованием так называемого двойного патогена, который может изменять, в том числе в сторону утяжеления, форму и структуру инфекционного процесса [3]. Вероятно у больных ОД, у которых обнаруживают только РВА в фекалиях методом ИФА, не дающим 100%-ной возможности диагностировать текущую ротавирусную инфекцию, при выявлении синдрома колита следует максимально расширять режим обследования на маркеры возбудителей ОКИ, патогенетически способных его вызывать.

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА СИНДРОМА КОЛИТА В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ, СРАВНИВАЕМЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТУ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОКИ (2002–2004 гг.)

| Группы больных по результату детекции возбудителей ОКИ | Показатели | Наличие колита | | Всего |
|--|------------|----------------|------|-------|
| | | Есть | Нет | |
| РВА(+) в ИФА + рост <i>Shigella</i> spp. | N | 30 | 1 | 31* |
| | % | 96,8 | 3,2 | 100,0 |
| РВА(+) в ИФА | N | 52 | 7 | 59 |
| | % | 88,1 | 11,9 | 100,0 |
| Всего | N | 82 | 8 | 90 |
| | % | 91,1 | 8,9 | 100,0 |
| p = 0,2 | | | | |

Примечание. * У одного пациента этой группы отсутствовали результаты копрограммы и ректороманоскопии.

Дополнительное использование ПЦР метода в период эпидемиологического благополучия по дизентерии позволило выявить у больных с диагностированным синдромом колита достаточно широкий спектр энтеропатогенов (табл. 2).

В этой группе пациентов именно метод ПЦР-диагностики позволил выявить *Campylobacter* spp. и диагностировать протекавший по типу ОД кампилобактериоз, который расценили как основное заболевание и преимущественно в виде моноинфекции у каждого пятого больного (20,8%), а как сопутствующее при микст-ОКИ — у 4% больных.

ТАБЛИЦА 2. СПЕКТР ВЫЯВЛЕННЫХ ЭНТЕРОПАТОГЕНОВ У БОЛЬНЫХ С ДИАГНОСТИРОВАННЫМ СИНДРОМОМ КОЛИТА ПРИ ДОПОЛНИТЕЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЦР-МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ (2009–2011 гг.)

| Энтеропатоген | N | % |
|----------------------------------|-----|------|
| Шигелла | 19 | 11,0 |
| Кампилобактер | 36 | 20,8 |
| Сальмонелла | 31 | 17,9 |
| Эшерихия | 8 | 4,6 |
| Ротавирус | 9 | 5,2 |
| Астровирус | 2 | 1,2 |
| Норовирус | 30 | 17,3 |
| Бактериальная ассоциация | 24 | 13,9 |
| Бактериально-вирусная ассоциация | 9 | 5,2 |
| Вирусная ассоциация | 1 | 0,6 |
| Не выявлено | 4 | 2,3 |
| Всего больных | 173 | 100 |

ТАБЛИЦА 3. СПЕКТР ВЫЯВЛЕННЫХ ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОКИ У БОЛЬНЫХ С ДИАГНОСТИРОВАННЫМ СИНДРОМОМ КОЛИТА (2009–2011 гг.)

| Выявленный возбудитель ОКИ | N | % |
|--|----|-------|
| <i>Бактериально-вирусная ассоциация</i> | | |
| <i>S. flexneri</i> ² + ротавирус | 2 | 18,2 |
| <i>S. Enteritidis</i> ⁴ + ротавирус (ПЦР) | 1 | 9,1 |
| <i>S. Typhimurium</i> ⁴ + норовирус | 1 | 9,1 |
| <i>S. flexneri</i> ¹ + ротавирус (ПЦР) | 1 | 9,1 |
| <i>Shigella</i> spp. ³ + астровирус | 1 | 9,1 |
| <i>Campylobacter</i> spp. ³ + астровирус | 1 | 9,1 |
| <i>S. flexneri</i> ⁴ + <i>Campylobacter</i> spp. ³ + ротавирус ИФА | 1 | 9,1 |
| <i>Campylobacter</i> spp. ³ + норовирус | 3 | 27,3 |
| Всего | 11 | 100,0 |
| <i>Только вирусный возбудитель ОКИ</i> | | |
| ротавирус | 9 | 20,9 |
| ротавирус + норовирус | 1 | 2,3 |
| астровирус | 3 | 7,0 |
| норовирус | 30 | 69,8 |
| Всего | 43 | 100,0 |

Примечание. Методы выявления: ¹ культуральный; ² выявление специфических АТ в сыворотке крови; ³ ПЦР; ⁴ культуральный и ПЦР.

Из вирусных патогенов наряду с ротавирусом наиболее часто имела место детекция норовируса: как основное заболевание острую норовирусную моноинфекцию диагностировали у 17,3% больных, как сопутствующую при микст-ОКИ — у 8,1% пациентов. Ассоциации различных энтеропатогенов в клиническом материале больных этой группы выявляли практически у каждого пятого пациента (19,7%). Иллюстрацией трудностей, с которыми сталкиваются врачи при трактовке результатов расширенного лабораторного обследования, является разнообразие вариантов

формулирования окончательного диагноза. Часть вариантов формулирования, обусловленных симптоматикой и детекцией маркеров только вирусных патогенов (например, «Норовирусный энтероколит», «Астровирусный ГЭК», «Ротавирусная инфекция по типу ГЭК», «Ротавирусный ГЭК, сопутствующая норовирусная инфекция»), входит в определенное противоречие с представлениями об ОКИ вирусной этиологии [5]. Прицельный анализ случаев ОД с положительным результатом на вирусный энтеропатоген (54 человека), показал, что у каждого пятого больного этой группы (20,4%) имела место детекция ассоциации вирусно-бактериальных возбудителей ОКИ (табл. 3).

В группе 15 больных с положительным результатом на ротавирус у 6 из них имела место детекция ассоциации ротавируса с маркерами других, в подавляющем большинстве бактериальных (у 5 из 6 человек), энтеропатогенов.

Выводы

У взрослых больных острой диареей с колитическим синдромом, у которых при рутинном обследовании обнаруживают только маркеры вирусных энтеропатогенов, следует считать целесообразным дополнительный настойчивый поиск маркеров бактериальных возбудителей, патогенетически способных вызывать колит.

Комплексное (с включением ПЦР-метода) специфическое лабораторное обследование взрослых больных ОКИ позволяет расширить возможности детекции маркеров как вирусных, так и бактериальных энтеропатогенов, но требует патогенетически корректной (с учетом клинической симптоматики) интерпретации результатов для обоснованной тактики ведения пациентов.

Список литературы/References

- Бахтояров Г.Н., Лободанов С.А., Марова А.А., Мескина Е.Р., Зверев В.В., Файзулоев Е.Б. Определение генетической структуры ротавирусов группы А // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 6 (67). С. 35–39. [Bahtoyarov G.N., Lobodanov S.A., Marova A.A., Meskina E.R., Zverev V.V., Phaizuloiev E.B. Determination of the genetic structure of group A rotaviruses circulating in the Moscow region, by PCR in real time. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2012, no. 6 (67), pp. 35–39. (In Russ.)]
- Лобзин Ю.В., Огарков П.И., Сиволодский Е.П., Корольков В.Ф., Речкин В.И., Семешенко И.Е., Финогеев Ю.П., Захаренко С.М., Винакмен Ю.А. Дизентерия и другие острые кишечные диарейные инфекции. Указания по диагностике, лечению и профилактике в ВС РФ. М., 2000. 197 с. [Lobzin Yu.V., Ogarkov P.I., Sivolodskii E.P., Korol'kov V.F., Rechkin V.I., Semeshchenko I.E., Finogeev Yu.P., Zakharenko S.M., Vinakmen Yu.A. Dizenteriya i drugie ostrye kishhechnye diareinye infektsii. Ukazaniya po diagnostike, lecheniyu i profilaktike v VS RF [Dysentery and other acute diarrheal intestinal infections. Guidelines on diagnostics, treatment and prevention in military forces of RF]. *Moscow, 2000, 197 p.*]
- Миллер Г.Г. Микстинфектология. Основные понятия, направления исследований, клиническое и общебиологическое значение (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. 2002. № 6. С. 25–32. [Miller G.G. Mixed infections. Basic determinations, research directions, clinical and biological burden (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2002, no. 6, pp. 25–32. (In Russ.)]
- Яковлев А.А., Погромская М.Н., Федуняк И.П., Мусатов В.Б., Кутузов В.Н., Горбова И.В., Кафтырева Л.А., Коржавев Ю.Н., Петрова Л.В. Этиологическая характеристика и практические уроки крупнй вспышки острой кишечной

- инфекции среди трудовых мигрантов // Журнал инфектологии, 2013, № 4. С. 55–60. [Yakovlev A.A., Pogromskaya M.N., Fedunyak I.P., Musatov V.B., Kutuzov V.N., Gorbova I.V., Kaftyreva L.A., Korzhaev Yu.N., Petrova L.V. Etiological characteristics and practical lessons of a major outbreak of acute intestinal infection among migrant workers. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2013, no. 4, pp. 55–60. (In Russ.)]
5. Ajami N.J., Koo H.L., Darkoh C., Atmar R.L., Jiang Z.D., DuPont H.L. Characterization of norovirus-associated travelers' diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 51, no. 2, pp. 123–130. doi: 10.1086/653530
 6. Dutta S., Chatterjee A., Dutta P., Rajendran K., Roy S., Pramanik K.C., Bhattacharya S.K. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.*, 2001, vol. 50, no. 8, pp. 667–674. doi: 10.1099/0022-1317-50-8-667
 7. Koo H.L., Ajami N., Atmar R.L., DuPont H.L. Noroviruses: the leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov. Med.*, 2010, vol. 10, no. 50, pp. 61–70.
 8. Thouillot F., Delhostal C., Edel C., Bettinger A., Pothier P., Ambert-Balay K., Meffre C., Alsibai S. Gastroenteritis outbreaks in elderly homes in the east of France during winter 2009/10: aetiology research for a series of 37 outbreaks. *Euro Surveill.*, 2012, vol. 17, iss. 9: pii=20103. URL: www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20103
 9. Trop Skaza A., Beskovnik L., Zohar Cretnik T. Outbreak of rotavirus gastroenteritis in a nursing home, Slovenia. *Euro Surveill.* 2011, vol. 16, iss. 14: pii=19837. URL: www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19837

Авторы:

Кожухова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций НИЦ при кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;
Андреева Н.В., врач-инфекционист организационно-методического отдела инфекционной службы СПбФГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия;
Иващенко В.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций НИЦ при кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kozhukhova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Chronic Viral Infection Laboratory of the Research Center (Branched from Infectious Diseases and Epidemiology Department), Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Andreeva N.V., Physician, Organizational and Methodical Department Of Infectious Disease Service, Hospital named after S.P. Botkin for Infectious Diseases In Adults, St. Petersburg, Russian Federation;
Ivaschenko V.D., PhD (Medicine), Senior Researcher, Chronic Viral Infection Laboratory of the Research Center (Branched from Infectious Diseases and Epidemiology Department), Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.04.2016
 Принята к печати 28.04.2016

Received 14.04.2016
 Accepted 28.04.2016

ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ БРУЦЕЛЛЕЗОМ

Н.И. Ковалевич¹, Н.С. Саркисян¹, Е.Л. Ракитина¹, В.А. Галяс¹, И.В. Санникова²,
О.В. Махиня²

¹ ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

² ГБОУ ВПО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Цель исследования состояла в определении уровня провоспалительных цитокинов: IL-12, IL-8 и IFN γ , неоптерина и липополисахарид-связывающего белка в сыворотке крови больных острым бруцеллезом до и после проведения антибактериальной терапии. Объектом исследования послужил клинический материал от 32 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «Острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя. Концентрации цитокинов IL-12, IL-8, IFN γ и острофазных белков определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. В острую фазу бруцеллезной инфекции (до лечения) отмечался высокий уровень провоспалительных цитокинов IL-8 и IFN γ , но несмотря на проведенный курс антибиотикотерапии в сыворотке крови больных сохранился высокий уровень IL-8, свидетельствующий о активном воспалении при отсутствии клинических проявлений. Уровень IL-12, ключевого цитокина в инициации лимфоцит-зависимого иммунного ответа, был ниже, чем в контрольной группе. Оценка цитокинового статуса (IL-8, IL-12, IL-18) и белков острой фазы воспаления (неоптерина и липополисахарид-связывающего белка) позволила получить ценную информацию для мониторинга эффекта фармакотерапии острого бруцеллеза. Показатели уровня липополисахарид-связывающего белка и неоптерина в сыворотке больных бруцеллезом следует рассматривать как маркер активности воспалительного процесса и как предиктор исходов острого бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, цитокины, белки острой фазы воспаления, иммунный ответ, диагностика, иммунопатогенез.

THE INFLUENCE OF PATHOGENETIC THERAPY ON THE LEVER OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH ACUTE BRUCELLOSIS

Kovalevich N.I.^a, Sarkisyan N.S.^a, Rakitina E.L.^a, Galyas V.A.^a, Sannikova I.V.^b, Makhinya O.V.^b

^a Federal Governmental Health Agency Stavropol anti Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol, Russian Federation

^b Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to determine the level of proinflammatory cytokines: IL-12, IL-8 and IFN γ , neopterin and lipopolysaccharide-binding protein in the serum of patients with acute brucellosis before and after antibiotic therapy. The clinical data from 32 patients with laboratory-confirmed diagnosis — “acute brucellosis” admitted

Адрес для переписки:

Саркисян Нушик Сааковна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
Ставропольский противочумный институт.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03.
E-mail: nyshik@yandex.ru

Contacts:

Nyshik S. Sarkisyan
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13-15,
Stavropol anti Plague Institute.
Phone: +7 (4967) 36-00-03.
E-mail: nyshik@yandex.ru

Библиографическое описание:

Ковалевич Н.И., Саркисян Н.С., Ракитина Е.Л., Галяс В.А., Санникова И.В., Махиня О.В. Влияние патогенетической терапии на содержание цитокинов у больных острым бруцеллезом // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 384–388.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-384-388

© Ковалевич Н.И. и соавт., 2016

Citation:

Kovalevich N.I., Sarkisyan N.S., Rakitina E.L., Galyas V.A., Sannikova I.V., Makhinya O.V. The influence of pathogenetic therapy on the lever of cytokines in patients with acute brucellosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 384–388.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-384-388

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-4-384-388>

to the diagnosis, treatment and examination of occupational diseases brucellosis GBUZ SC "City Clinical Hospital No. 2", the city of Stavropol were used in the study. The concentrations IL-12, IL-8, IFN γ cytokines and acute-phase proteins in serum was determined by ELISA. In the acute phase of brucellosis infection (before treatment) had high levels of pro-inflammatory cytokines IL-8 and IFN γ , but despite holding a course of antibiotic treatment in the serum of patients with preserved high levels of IL-8, indicative of active inflammation in the absence of clinical manifestations. IL-12 level, a key cytokine in the initiation of lymphocyte-dependent immune response was lower than in the control group. Evaluation of the cytokine status (IL-8, IL-12, IL-18) and proteins of acute inflammation phase (neopterin and lipopolysaccharide-binding protein) will provide valuable information for monitoring the effect of pharmacotherapy of acute brucellosis. Indicators of lipopolysaccharide-binding protein and neopterin in the serum of patients with brucellosis should be considered as a marker of inflammatory activity and as a predictor of outcome of acute brucellosis.

Key words: *brucellosis, cytokines, acute phase proteins of inflammation, immune responses, diagnostics, immunopathogenesis.*

В Северо-Кавказском и Южном федеральных округах наблюдается напряженная эпидемическая ситуация по бруцеллезу [3]. Бруцеллез является широко распространенным инфекционно-аллергическим заболеванием с длительной персистенцией возбудителя и стертой клинической картиной. Существующие методы диагностики и прогноза течения заболевания имеют ряд недостатков, поэтому актуальной задачей является поиск надежных, малоинвазивных методов выявления биомаркеров крови. В качестве биомаркеров могут выступать цитокины — медиаторы хронического воспаления, непосредственно участвующие в иммунопатогенезе бруцеллеза.

Патогенетической основой практически закономерной трансформации острой стадии инфекции в хроническую является несостоятельность врожденного и адаптивного иммунитета в отношении бруцелл с созданием условий для незавершенного фагоцитоза и долгосрочного внутриклеточного паразитирования [2, 3, 5, 6, 7, 10]. Известно, что в комбинированном иммунодефиците при бруцеллезе ключевая роль принадлежит клеточному иммунитету и дисбалансу Th1, про- и противовоспалительных цитокинов, а также интерферонов (IFN), прежде всего IFN γ , необходимых для элиминации возбудителя [1, 8]. Адекватный клеточный иммунный ответ (Th1) имеет решающее значение для обезвреживания бруцелл. Элиминация возбудителя обусловлена продукцией цитокинов Th1. Установлено, что при бруцеллезной инфекции ключевым цитокином в формировании ответной воспалительной реакции IFN γ , продуцентами которого являются активированные Т-лимфоциты и естественные киллеры, а индуктором синтеза является интерлейкин-12 (IL-12). Дисбаланс субпопуляций Th1 и цитокинов, продуцируемых ими, ассоциируется с длительной персистенцией бруцелл в организме человека и исходом инфекции (выздоровление или рецидив).

Изучение уровня специфических острофазовых показателей неоптерина и липополисахарид-связывающего белка (ЛПС-белок) в корреляции с комплексом провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-12, IL-18) в сыворотке крови позволит расширить представления о патогенезе бруцеллеза.

Так, ЛПС-белок относится к белкам острой фазы и синтезируется в клетках печени, легких и энтероцитах под действием IL-1, IL-6 [1]. Этот белок играет центральную роль в ответ на попадание липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий путем прочного их связывания. ЛПС-белок катализирует перенос ЛПС грамотрицательных бактерий на CD14-рецептор белок экспрессированный на поверхности макрофагов и распознающий ЛПС. В результате чего происходит запуск каскада реакций, приводящих в конечном итоге к активации основных клеточных функций, связанных с развитием фагоцитоза и синтезом провоспалительных цитокинов IL-12, IL-18 [10].

Одним из серологических маркеров активации Th1-типа иммунного ответа является неоптерин, представляющий собой метаболит нуклеиновых оснований, схожий по структуре с молекулой фолиевой кислоты [4]. Он образуется в активированных моноцитах и макрофагах из гуанозинтрифосфата. Основным индуктором его синтеза является IFN γ , при этом другие Th1 провоспалительные цитокины (TNF α и IL-2) резко усиливают стимулированную IFN γ выработку неоптерина [9]. Это дает основание рассматривать неоптерин в качестве интегрального показателя цитокинзависимой активации моноцитов/макрофагов [6].

Целью исследования явилось определение уровня провоспалительных цитокинов: IL-12, IL-8 и IFN γ , неоптерина и липополисахарид-связывающего белка в сыворотке крови больных острым бруцеллезом до и после проведения антибактериальной терапии.

Материалы и методы

Объектом исследования послужил клинический материал от 32 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «Острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2», г. Ставрополя. Диагноз бруцеллеза устанавливался на основании данных эпидемиологических, клинических и лабораторных исследований. Группу сравнения составили здоровые люди ($n = 20$), сопоставимые по полу и возрасту с больными бруцеллезом, не болевшие бруцеллезом и не вакцинированные против этой инфекции.

Методом твердофазного иммуноферментного анализа было проведено определение уровня IL-12, IL-8 в сыворотке крови с использованием тест-систем Flow Cytomix Simplex Kit («Bender MedSystems GmbH», Австрия). IFN γ в сыворотке крови исследовали с помощью тест-системы А-8752 «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ», Россия. Определение уровня неоптерина выполняли с использованием тест-систем Neopterin ELISA «IBL, Hamburg». Липополисахарид-связывающий белок определяли тест-системой Human LBP, ELISA. Определение изучаемых показателей проводили до и после проведения курса антибиотикотерапии. Терапия проводилась в течение 6 недель, в схеме доксициклин и рифампицин.

Обеззараживание исследуемого материала осуществляли в соответствии СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Для статистического анализа использовали T-критерий Уилкоксона (до и после лечения) и t-критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей (сравнение с группой здоровых). Уровень достоверности принимали равным $p < 0,05$. В качестве критериев активности воспаления использовали рутинные лабораторные тесты: уровень лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), острофазный белок — С-реактивный белок (СРБ).

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования установлено, что у больных острым бруцеллезом до приема антибиотикотерапии уровень IL-12 составил $25,66 \pm 0,72$ пг/мл, что ниже ($p < 0,05$) показателя в группе здоровых людей ($31,75 \pm 0,72$ пг/мл). После лечения уровень IL-12 не изменился ($25,87 \pm 0,89$ пг/мл; $p > 0,05$). Уровень IL-8 до лечения значительно ($p < 0,05$) превысил показатель в контрольной группе ($4,33 \pm 0,8$ пг/мл) и составил $8,66 \pm 0,59$ пг/мл. После лечения антибиотиками уровень IL-8 оставался высоким ($8,76 \pm 0,96$ пг/мл), не отличаясь от исходного ($p > 0,05$). Показатели IFN γ в сыворотке крови больных до проведения терапии значительно превышали показатели в контрольной группе ($3,35 \pm 0,6$ пг/мл), составляя $18,22 \pm 5,03$ пг/мл ($p < 0,05$). После завершения курса антибактериальной терапии значения были в пределах референсных (допустимых значений) ($7,19 \pm 3,03$ пг/мл; $p > 0,05$).

У больных острым бруцеллезом до лечения антибиотиками показатель липополисахарид-связывающего белка составил $52,2 \pm 0,77$ пг/мл,

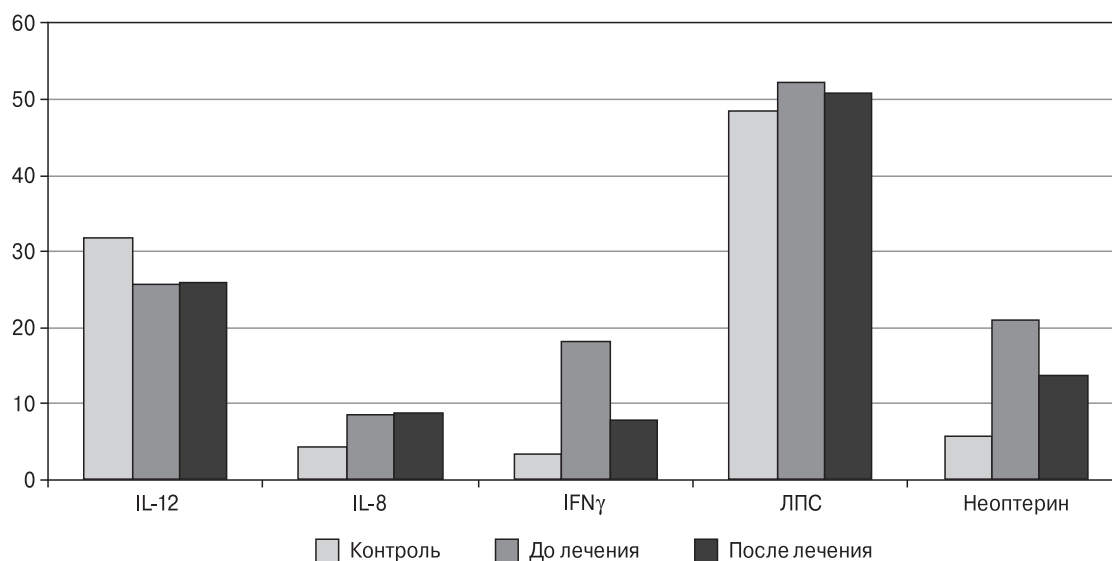


Рисунок. Сравнительные значения провоспалительных цитокинов и острофазовых показателей воспалительного процесса при остром бруцеллезе

($p < 0,05$), а после курса антибиотикотерапии — $50,79 \pm 0,78$ пг/мл. Уровень неоптерина в сыворотке крови больных бруцеллезом до начала специфической терапии составил $21,01 \pm 3,6$ нмоль/л, что значительно выше в сравнении с группой контроля ($5,7 \pm 0,54$ нмоль/л; $p < 0,05$). После окончания курса антибиотикотерапии уровень неоптерина снизился до $13,69 \pm 3,39$ нмоль/л, что ниже в сравнении с его уровнем до лечения ($p < 0,05$), но выше чем у здоровых людей ($p < 0,05$). Общее количество лейкоцитов в периферической крови оставалось в пределах нормальных значений ($4,0-9,0 \times 10^9$ /л) независимо от лечения. Уровень СОЭ до лечения составил $20,91 \pm 1,94$ мм/ч, что выше в сравнении со значениями в контрольной группе ($p < 0,05$), а после антибактериальной терапии показатели были в пределах нормы ($11,66 \pm 1,75$ мм/ч). Уровень С-реактивного белка в сыворотке крови только у части больных (12,5%) до лечения превышал нормальные значения, средний уровень составил $15,63 \pm 3,05$, что не превышало значения нормы. Данные о провоспалительных цитокинах и острофазовых показателях представлены на рисунке.

В острую фазу бруцеллезной инфекции (до лечения) отмечается высокий уровень провоспалительных цитокинов IL-8 и IFN γ (рис.). Несмотря на проведенный курс антибиотикотерапии, в сыворотке крови больных сохраняется высокий уровень IL-8, свидетельствующий об активном воспалении при отсутствии клинических проявлений. В сыворотке крови больных острым бруцеллезом уровень IL-12 — ключевого цитокина в инициации лимфоцит-зависимого иммунного ответа — был ниже, чем в контрольной группе. Селективная ингибция синтеза

IL-12 при сохранении продукции других провоспалительных цитокинов (IL-8, IFN γ), вероятно, является одним из факторов длительной персистенции бруцелл в организме хозяина. Показатели уровня ЛПС-белка и неоптерина в сыворотке больных бруцеллезом следует рассматривать как маркер активности воспалительного процесса и как предиктор исходов острого бруцеллеза.

Таким образом, в развитии и течении бруцеллеза важная роль принадлежит цитокинам. С их помощью реализуется широкое взаимодействие на субклеточном, клеточном, органном, системном уровнях, формирование комплексной защитной реакции, направленной на нейтрализацию патогенных агентов, их разрушение, элиминацию из организма, сохранение его структурной и функциональной целостности. В организме цитокины тесно взаимодействуют между собой, образуют универсальную коммуникационную биологическую сеть, запускающую и регулирующую целый каскад воспалительных, иммунных, метаболических процессов. Провоспалительные цитокины усиливают воспаление, явления альтерации, деструкции, стимулируют синтез острофазных белков. Продолжительный, повышенный синтез цитокинов может стать фактором прогрессирования патологического процесса, оказывая прямое повреждающее действие на клетки и ткани, индуцируя альтерацию, нарушение целостности сосудистой стенки, усиление и хронизацию воспалительного процесса.

Комплексная оценка цитокинового статуса (IL-8, IL-12, IL-18) и белков острой фазы воспаления (неоптерина и ЛПС-белка) позволяет получить ценную информацию для мониторинга эффекта терапии острого бруцеллеза.

Список литературы/References

1. Жумадилова З.К., Байсугуров Ж.Б. Ферментные системы фагоцитирующих мононуклеаров при различных вариантах течения бруцеллеза // Здравоохранение Казахстана. 1989. № 6. С. 29–31. [Zhumadilova Z.K., Baysugurov J.B. Mononuclear phagocyte enzyme system in different variants of flow of brucellosis. *Zdravookhranenie Kazakhstana = Healthcare in Kazakhstan*, 1989, no. 6, pp. 29–31 (In Russ.)]
2. Инфекционные болезни: национальное руководство / под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 1040 с. [Infektsionnye bolezni: natsional'noe rukovodstvo / pod red. N.D. Yushchuka, Yu.Ya. Vengerova [Infectious diseases: national guideline. Eds. N.D. Yushchuk, U.Yu. Vengerov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 1040 p.]
3. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В., Зайцев А.А., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах — участниках Содружества Независимых Государств // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2016. № 1. С. 68–74. [Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Vilinskaya S.V., Zaitsev A.A., Kulichenko A.N. Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation and the states — participants of the Commonwealth of Independent States. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2016, no. 1, pp. 68–74. (In Russ.)]
4. Свиридов Е.А., Телегина Т.А. Неоптерин и его восстановленные формы: биологическая роль и участие в клеточном иммунитете // Успехи биологической химии. 2005. Т. 45. С. 355–390. [Sviridov E.A., Telegina T.A. Neopterin and its reduced forms: biological role and participation in cellular immunity. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biochemistry*, 2005, vol. 45, pp. 355–390. (In Russ.)]
5. Ariza J., Corredoira J., Pallares R., Viladrich P.F., Rufi G., Pujol M., Gudiol F. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, vol. 20, pp. 1241–1249. doi: 10.1093/clinids/20.5.1241
6. Boschiroli M.L., Foulongne V., Callaghan D.O. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001, vol. 4, pp. 58–64. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00165-X

7. Liautard J.P., Gross A., Dornand J., Köhler S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia*, 1996, vol. 12 (2), pp. 197–206.
8. Mantur B.G., Amarnath S.K., Shinde R.S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *J. Indian Med. Microbiol.*, 2007, vol. 25 (3), pp. 188–202. doi: 10.4103/0255-0857.34758
9. Ocon P., Reguera J.M., Morata P., Juarez C., Alonso A., Colmenero J.D. Phagocytic cell function in active brucellosis. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, pp. 910–914.
10. Skendros P., Pappas G., Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect.*, 2011, vol. 13 (2), pp. 134–142. doi: 10.1016/j.micinf.2010.10.015

Авторы:

Ковалевич Н.И., к.м.н., зав. научно-профилактической клинико-диагностической лабораторией ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Саркисян Н.С., врач клинической лабораторной диагностики научно-профилактической клинико-диагностической лаборатории ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Ракитина Е.Л., к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Галяс В.А., врач клинической лабораторной диагностики научно-профилактической клинико-диагностической лаборатории ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Санникова И.В., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней и фтизиатрии ГБОУ ВПО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия;

Махиня О.В., аспирант кафедры инфекционных болезней и фтизиатрии ГБОУ ВПО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Kovalevich N.I., PhD (Medicine), Head of the Research and Prevention Clinical Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Sarkisyan N.S., Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Research and Prevention Clinical Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Brucellosis, Sector of Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infections, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Galyas V.A., Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Research and Prevention Clinical Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Sannikova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Infectious Diseases and Phthisiatry, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation;

Makhinya O.V., PhD Candidate, Department of Infectious Diseases and Phthisiatry, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

Я.В. Подкопаев¹, Л.В. Домотенко¹, А.Н. Круглов², И.В. Рябченко², К.В. Детушев¹, Т.П. Морозова¹, А.П. Шепелин¹

¹ ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия

² Национальное агентство клинической фармакологии и фармации, Москва, Россия

Резюме. В Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии разработаны две питательные среды для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов: Шоколадный агар и ГБМ-агар. Ранее в ходе лабораторных исследований с использованием музейных штаммов микроорганизмов было показано, что эти питательные среды обладают высокой чувствительностью и обеспечивают рост штаммов *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* при посеве микробных суспензий, содержащих единичные клетки. Использование в обеих средах селективных добавок для выделения гемофильной палочки, менингококка или пневмококка позволяет избирательно выделять искомые микроорганизмы, подавляя рост сопутствующей микрофлоры. В настоящем исследовании проводилась оценка эффективности разработанных питательных сред при бактериологическом исследовании клинических образцов из верхних и нижних дыхательных путей. При бактериологическом посеве 90 образцов мазков из зева, взятых от детей и взрослых в возрасте от 0 до 66 лет с заболеваниями верхних дыхательных путей, на Шоколадный агар, ГБМ-агар и контрольную питательную среду без использования селективных добавок выделено одинаковое число культур микроорганизмов. Из 154 выделенных культур микроорганизмов две принадлежали к виду *Neisseria meningitidis*, 23 — к виду *Streptococcus pneumoniae* и 9 культур идентифицировано как *Haemophilus influenzae*. Бактериологический посев 10 образцов мазков из зева, взятых от здоровых людей в возрасте от 30 до 55 лет, на испытываемые и контрольные среды с селективными добавками позволил без количественных потерь избирательно выделить культуры *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* и подавить рост сопутствующей микрофлоры. В ходе исследования Шоколадный агар и ГБМ-агар не уступали по ростовым свойствам контрольным средам, используемым в клинической практике для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов.

Ключевые слова: Шоколадный агар, ГБМ-агар, селективные добавки, питательные среды, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

Адрес для переписки:

Подкопаев Ярослав Васильевич
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,
п. Оболенск, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03.
E-mail: podkopaev@obolensk.org

Contacts:

Yaroslav V. Podkopaev
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center of Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-00-03.
E-mail: podkopaev@obolensk.org

Библиографическое описание:

Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Круглов А.Н., Рябченко И.В.,
Детушев К.В., Морозова Т.П., Шепелин А.П. Сравнительная
оценка питательных сред для выделения возбудителей гнойных
бактериальных менингитов // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4.
С. 389–394. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-389-394

Citation:

Podkopaev Ya.V., Domotenko L.V., Kruglov A.N., Ryabchenko I.V.,
Detushev K.V., Morozova T.P., Shepelin A.P. Comparative evaluation
of culture media for pathogen isolation of purulent bacterial meningitis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016,
vol. 6, no. 4, pp. 389–394. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-389-394

COMPARATIVE EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR PATHOGEN ISOLATION OF PURULENT BACTERIAL MENINGITIS

Podkopaev Ya.V.^a, Domotenko L.V.^a, Kruglov A.N.^b, Ryabchenko I.V.^b, Detushev K.V.^a, Morozova T.P.^a, Shepelin A.P.^a

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

^b National Agency for Clinical Pharmacology and Pharmacy

Abstract. The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology has designed two nutrient media — chocolate agar and PBM-agar to isolate pathogens of purulent bacterial meningitis (PBM). In our previous research using collected microbial strains the media were shown to be highly susceptible and to provide the growth of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains, when inoculated with microbial suspensions containing single cells. When isolating *Haemophilus influenzae*, meningococci, and pneumococci the use of selective additives in both media assures selective isolation of required microorganisms, inhibiting contaminants. The objective of this research was to assess the media in bacteriological tests of clinical samples collected from the upper and lower respiratory tract in humans. The bacteriological plating of throat smear specimens (n = 90) from children and adults at the age of 0 to 66 with disorder of the upper respiratory tract on chocolate agar, PBM-agar and on a control medium in the absence of selective additives resulted in the equal amount of microbial cultures isolated. Of 154 isolated cultures 2, 23 and 9 were attributed to *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, respectively. The plating of throat smears (n = 10) from healthy people at the age of 30 to 55 on the analyzable and control media in the presence of additives allowed us to selectively isolate *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* cultures without a quantitative loss, with contaminants inhibited. By their growth characteristics chocolate agar and PBM-agar were highly competitive with reference media being used in clinical practice for isolating main causative agents of purulent bacterial meningitis.

Key words: Chocolate agar, *Haemophilus* agar, PBM-agar, selective supplements, culture medium, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

Введение

Среди патогенов человека *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* играют ведущую роль в качестве возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ) [4]. При этом немаловажное значение эти микроорганизмы занимают и в этиологической структуре респираторных инфекций верхних дыхательных путей. *H. influenzae* и *S. pneumoniae* вызывают бронхит, острый средний отит, острый бактериальный синусит, пневмонию [2, 3, 6]. *N. meningitidis* вызывает острый менингококковый назофарингит, который может перерасти в генерализованную форму менингококковой инфекции (менингит, менингококцемию) [1].

Особенности питательных потребностей этих микроорганизмов не позволяют применять при их выделении простые питательные среды. В клинической практике для всех трех возбудителей обычно используют шоколадный или кровяной агары. Для избирательного выделения *H. influenzae* применяют шоколадный агар с добавлением бацитрацина, для *S. pneumoniae* — кровяной агар с гентамицином, для *N. meningitidis* — сывороточный агар с линкомицином [2, 3, 4, 7].

В ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) разработаны две питательные среды для выделения возбудителей гнойных бактериальных

менингитов: Шоколадный агар и ГБМ-агар. Шоколадный агар — готовая к применению питательная среда, которая выпускается в виде набора, состоящего из разлитой во флаконы основы, лиофильно высушенных ростовой добавки и трех селективных добавок: для выделения гемофильной палочки (СД-Г), для выделения пневмококка (СД-П) и для выделения менингококка (СД-М). ГБМ-агар — сухая питательная среда, которая состоит из основы, ростовой добавки и может быть использована совместно с СД-Г, СД-П или СД-М. Ранее нами опубликованы результаты лабораторных исследований разработанных сред с использованием музейных штаммов микроорганизмов [5]. Показано, что они обладают высокой чувствительностью и обеспечивают рост штаммов *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* при посеве микробных суспензий, содержащих единичные клетки. Использование селективных вариантов обеих сред для выделения гемофильной палочки (с добавлением СД-Г) полностью подавляло рост грамположительных микроорганизмов и некоторых грамотрицательных микроорганизмов. Добавление СД-М в Шоколадный агар и ГБМ-агар не влияло на рост *N. meningitidis* и полностью ингибировало рост большинства исследованных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, включая *H. influenzae* и *S. pneumoniae*. При добавлении СД-П к обеим питательным средам наблюдалось полное подавление роста всех исследован-

ных штаммов грамотрицательных микроорганизмов, включая *H. influenzae* и *N. meningitidis*. На всех селективных вариантах полностью подавлялся рост музейных штаммов дрожжеподобных грибов [5].

Целью настоящего исследования является оценка эффективности Шоколадного агара и ГБМ-агара при бактериологическом исследовании клинических образцов из верхних и нижних дыхательных путей.

Материалы и методы

Исследование состояло из двух этапов. На первом этапе проводили бактериологический посев мазков из зева на Шоколадный агар и ГБМ-агар без использования селективных добавок. На втором этапе осуществляли выделение *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* на селективных вариантах Шоколадного агара и ГБМ-агара с использованием СД-Г, СД-П и СД-М.

В ходе выполнения первого этапа исследования проводили бактериологический посев из 90 клинических образцов от детей и взрослых в возрасте от 0 до 66 лет с заболеваниями верхних дыхательных путей, поступивших на исследование в Национальное агентство клинической фармакологии и фармации из лечебно-профилактических учреждений города Москвы и Московской области. Клинические образцы поступали на тампонах, помещенных в транспортную систему Эймса с углем (HiCulture Transport Swabs with Amies Transport Medium with Charcoal, HiMedia, кат. № MS651). Посев исследуемого материала производили методом трехсегментного истоающего мазка.

В ходе выполнения второго этапа исследуемым материалом служили 10 образцов мазков из зева, взятых от здоровых людей в возрасте от 30 до 55 лет. Для взятия материала использовали стерильные одноразовые ватные тампоны (Aptaca, кат. № 5100/SG/CS). Тампоны с мазками сразу после взятия помещали в 1,5 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида и суспензировали на встряхивателе для пробирок Vortex со скоростью 1500 об./мин в течение 15 с. По 0,1 мл каждой полученной суспензии высевали на чашки Петри с исследуемыми и контрольными средами.

В работе использовали питательную среду для культивирования и выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовую к применению (Шоколадный агар, регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13081) и питательную среду для культивирования и выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухую (ГБМ-агар, по ТУ 9385-203-78095326-2013).

В качестве контрольной среды на первом этапе использовали кровяной агар, приготовленный из колумбийского агара (Columbia blood agar base, Oxoid) с добавлением 5% крови. Дополнительно для выделения и дифференциации энтеробактерий, нефементирующих грамотрицательных микроорганизмов, стафилококков и грибов использовали агары Эндо, маннитол-солевой и Сабуро.

На втором этапе при сравнительном исследовании питательных сред для выделения гемофильной палочки в качестве контроля использовали гонококковый агар (GC Medium Base, GC Medium Base, Becton Dickinson, кат. № 211275) с добавлением 1% гемоглобина (Hemoglobin Bovine, Freeze-Dried, Becton Dickinson, кат. № 212392), смеси факторов роста IsoVitalex (Becton Dickinson, кат. № 211875) и бацитрацина (500 мг/л); для выделения пневмококка — кровяной агар на основе питательной среды № 1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением 5% бараньей крови и гентамицина (5 мг/л); для выделения менингококка — сывороточный агар на основе питательной среды № 1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением 20% сыворотки бычьей (Sterile Adult Bovine Serum, Bovogen, кат. № SABS) и линкомицина (5 мг/л).

Чувствительность к полимиксину и линкомицину выделенных представителей рода *Neisseria* определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллера—Хинтона (Mueller Hinton II Agar, Becton Dickinson) с использованием дисков индикаторных с полимиксином 300 ЕД и линкомицином 15 мкг (НИЦФ).

Посевы инкубировали 24–48 ч при температуре 37°C в атмосфере 5–10% CO₂. Первичную дифференциацию выросших колоний микроорганизмов проводили по морфологическим признакам. Для дальнейшей идентификации колонии пересевали на Шоколадный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) и через 18–24 ч инкубирования исследовали методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) на MALDI Biotyper 3.0 Microflex (Bruker). Для дифференциации *S. pneumoniae* от других стрептококков проводили оптохиновый тест на кровяном агаре без гентамицина, используя диски с оптохином (HiMedia, кат. № DD009R).

Результаты и обсуждение

При исследовании клинического материала от больных на неселективных вариантах сред учитывали и отбирали для дальнейшей идентификации только колонии микроорганизмов, подозрительные на колонии этиологических агентов заболевания. В первую оче-

редь колонии, похожие на *H. influenzae* (серые слизистые блестящие колонии), *N. meningitidis* (полупрозрачные блестящие колонии сероватого цвета с идеально ровными краями), *S. pneumoniae* (мелкие полупрозрачные четко очерченные, не склонные к слиянию колонии, в зоне роста которых на кровяном агаре наблюдался α -гемолиз, на ГБМ-агаре — обесцвечивание питательной среды, на Шоколадном агаре — изменение цвета среды с коричневого на зеленый).

Всего из 90 образцов было выделено 154 культуры микроорганизмов, представленных 10 родами (табл. 1). Как видно из таблицы, наибольшее количество выделенных на испытуемых и контрольной средах микроорганизмов принадлежит к роду *Streptococcus*, представители которого в высоких концентрациях обнаружены практически во всех исследованных образцах. При этом искомым видом стрептококков, *S. pneumoniae*, обнаружен в 23 образцах клинического материала — как на обеих испытуемых средах, так и на кровяном агаре.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ПРИ ПОСЕВЕ НА СРЕДЫ БЕЗ СЕЛЕКТИВНЫХ ДОБАВОК

| Выделенные микроорганизмы | Количество образцов, из которых выделены микроорганизмы на питательных средах | | |
|---------------------------------------|---|----------|---------------|
| | Шоколадный агар | ГБМ-агар | Кровяной агар |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Acinetobacter junii</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Candida albicans</i> | 10 | 10 | 10 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Escherichia coli</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 9 | 9 | 9 |
| <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 2 | 2 | 2 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 | 23 | 23 |
| <i>Streptococcus anginosus</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Streptococcus mitis</i> group | 36 | 36 | 36 |
| <i>Streptococcus oryzihabitans</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 23 | 23 | 23 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> group | 27 | 27 | 27 |

Представители рода *Haemophilus* выделены на ГБМ-агаре, Шоколадном и кровяном агарах из 15 образцов, среди них на долю *H. influenzae* приходится 9 случаев обнаружения на каждой из питательных сред.

Колонии *N. meningitidis* обнаружены на испытуемых и контрольной средах при посеве только двух образцов.

Остальные выделенные и идентифицированные микроорганизмы относились к видам *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, а так же к роду *Acinetobacter*. Практически во всех образцах обнаружен рост сапрофитных нейссерий, но в связи с низкой диагностической значимостью они не включены в результаты исследования и не отражены в таблице 1.

Таким образом, количество выделенных микроорганизмов на обеих испытуемых средах и контрольной среде было одинаково, причем все они выделены из одних и тех же образцов. Колонии выделенных культур микроорганизмов на каждой испытуемой питательной среде не отличались от выросших на контрольной среде. Исключение составляли такие гемолитические микроорганизмы, как *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. parahaemolyticus* и некоторые виды стрептококков, которые в процессе роста не изменяли цвет ГБМ-агара и Шоколадного агара. Это с одной стороны, затрудняло предварительную дифференциацию данных микроорганизмов, но с другой стороны, облегчало выделение зеленеющих стрептококков, в первую очередь *S. pneumoniae*. Вокруг колоний *S. pneumoniae* на ГБМ-агаре наблюдалось заметное обесцвечивание, а на Шоколадном агаре — появление зеленого окрашивания среды. Отмечено также, что выделение *H. influenzae* на кровяном агаре было обусловлено способностью к сателлитному росту данного вида в присутствии других микроорганизмов, вызывающих β -гемолиз, в то время как испытуемые среды обеспечивают его рост и в монокультуре.

На втором этапе исследования при анализе клинического материала от здоровых людей на селективных вариантах питательных сред учитывали и отбирали для дальнейшего изучения все выросшие колонии микроорганизмов. Как видно из табл. 2, в результате исследования выделено и идентифицировано 14 видов микроорганизмов, относящихся к 6 родам. Использование селективных вариантов испытуемых питательных сред позволило подавить рост значительного количества микроорганизмов и легко обнаружить колонии искомым микроорганизмов.

Как и на первом этапе, наибольшее количество выделенных культур принадлежало к роду

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ПРИ ПОСЕВЕ НА СРЕДЫ С СЕЛЕКТИВНЫМИ ДОБАВКАМИ

| Выделенные микроорганизмы | Всего выделено | Количество образцов, из которых выделены микроорганизмы на питательных средах* | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|--|-----|------|----|------|----|-----|
| | | СД-Г | ГС | СД-П | КА | СД-М | СА | БСД |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | —** | — | — | — | — | — |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 9 | 9 | 8 | — | — | — | — | 7 |
| <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> | 3 | 3 | 3 | — | — | — | — | 2 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | — | — | — | — | — | — | 1 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | — | — | 1 | 1 | — | — | 1 |
| <i>Streptococcus mitis</i> | 6 | — | — | 6 | 6 | — | — | 6 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 4 | — | — | 4 | 4 | — | — | 4 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | 8 | — | — | 8 | 6 | — | — | 8 |
| <i>Kingella denitrificans</i> | 2 | — | — | — | — | 2 | — | 1 |
| <i>Neisseria flavescens</i> | 3 | — | — | — | — | — | 3 | 3 |
| <i>Neisseria lactamica</i> | 1 | — | — | — | — | — | 1 | 1 |
| <i>Neisseria macacae</i> | 4 | — | — | — | — | — | 4 | 4 |
| <i>Neisseria mucosa</i> | 1 | — | — | — | — | — | 1 | — |
| <i>Neisseria perflava</i> | 2 | — | — | — | — | 2 | 2 | 2 |

Примечания. * Питательные среды: СД-Г — Шоколадный агар и ГБМ-агар с селективной добавкой СД-Г; ГС — гонококковый агар с бацитрацином; СД-П — Шоколадный агар и ГБМ-агар с селективной добавкой СД-П; КА — кровяной агар с гентамицином; СД-М — Шоколадный агар и ГБМ-агар с селективной добавкой СД-М; СА — сывороточный агар с линкомицином; БСД — Шоколадный агар и ГБМ-агар без селективных добавок; ** «—» — рост не обнаружен.

Streptococcus, включая *S. pneumoniae* (в 4 образцах), *S. mitis* (в 6 образцах) и *S. salivarius* (в 8 образцах). Все они были выделены на ГБМ-агаре и Шоколадном агаре, как с использованием СД-П, так без селективной добавки. На кровяном агаре не удалось найти культуру *S. salivarius* в двух образцах.

В ходе исследования обнаружено 13 культур *Haemophilus* spp., включая, *H. influenzae* (в одном образце), *H. parainfluenzae* (в девяти образцах) и *H. parahaemolyticus* (в трех образцах). Причем, все идентифицированные штаммы были выделены на селективных вариантах обеих испытываемых сред, содержащих СД-Г. На контрольном ГС агаре найдено только 11 культур гемофилов. И, что особенно важно, культура *H. influenzae* выделена только на испытываемых средах. На не-селективном варианте испытываемых сред данная культура не была обнаружена среди большого количества колоний сопутствующих микроорганизмов. На ГС агаре рост колоний *H. influenzae* отсутствовал.

Ни в одном из исследованных клинических образцов не был обнаружен менингококк. Его не удалось обнаружить ни на одной питательной среде. Нейссерии других видов (*Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria macacae* и *Neisseria mucosa*) обнаружены на испытываемых средах без селективных добавок и на сывороточном агаре. На селективных вариантах испытываемых сред с добавлением СД-М выделена культура *Neisseria perflava*, которая при

дополнительном исследовании ее антибиотикочувствительности оказалась устойчивой к полимиксину, входящему в состав СД-М. Помимо *Neisseria perflava* на вариантах с СД-М выделена устойчивая к полимиксину культура *Kingella denitrificans*, которая была чувствительной к линкомицину и не росла на сывороточном агаре с линкомицином.

В ходе исследования отмечены также хорошие ингибирующие свойства селективных вариантов испытываемых сред. На средах с внесением СД-П помимо стрептококков ожидаемо обнаружен рост колоний *S. aureus*. К тому же ингибирующему эффекту приводит добавление гентамицина к кровяному агару: помимо стрептококков на среде выделена одна культура золотистого стафилококка.

Таким образом, в ходе проведения исследований клинического материала с использованием Шоколадного агара, ГБМ-агара и контрольной питательной среды без селективных добавок выделено одинаковое число культур, представителей 10 родов микроорганизмов. Использование испытываемых сред с селективными добавками позволило без количественных потерь избирательно выделить культуры *H. influenzae* и *S. pneumoniae* и подавить рост значительного числа микроорганизмов. Испытываемые среды не уступали по ростовым свойствам контрольным средам, используемым в клинической практике для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов.

Список литературы/References

1. Абрамцева М.В., Тарасов А.П., Немировская Т.И. Менингококковая инфекция. Современные представления о возбудителе, эпидемиологии, патогенезе и диагностике. Сообщение 1 // Биопрепараты. 2014. № 3. С. 4–10. [Abramtseva M.V., Tarasov A.P., Nemirowskaya T.I. Meningococcal infection: modern insight into epidemiology, pathogenesis, diagnosis and causative agent. *Biopreparaty = Biopreparation*, 2014, no. 3, pp. 4–10. (In Russ.)]
2. Богданович Т.М., Стецюк О.У., Кречикова О.И., Боронина Л.Г., Катосова Л.К., Фаустова М.Е. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 2. С. 93–109. [Bogdanovich T.M., Stecyuk O.U., Krechikova O.I., Boronina L.G., Katosova L.K., Faustova M.E. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, vol. 2, no. 2, pp. 93–109. (In Russ.)]
3. Кречикова О.И., Козлов Р.С., Богданович Т.М., Стецюк О.У., Суворов М.М., Катосова Л.К., Вишнякова Л.А., Фаустова М.Е. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 1. С. 88–98. [Krechikova O.I., Kozlov R.S., Bogdanovich T.M., Stetsyuk O.U., Suvorov M.M., Katosova L.K., Vishnyakova L.A., Faustova M.E. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, vol. 2, no. 1, pp. 88–98. (In Russ.)]
4. Методические указания МУК 4.2.1887-04. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. [Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1887-04. Laboratornaya diagnostika meningokokkovoi infektsii i gnoinykh bakterial'nykh meningitov [Methodical instructions MUK 4.2.1887-04. Laboratory diagnosis of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis]. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology, 2005]
5. Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Храмов М.В., Шепелин А.П. Отечественные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. № 5. С. 59–64. [Podkopaev Ya.V., Domotenko L.V., Morozova T.P., Khramov M.V., Shepelin A.P. The national nutrient medium for diagnostic of purulent bacterial meningitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, no. 5, pp. 59–64. (In Russ.)]
6. Харит С.М., Перова А.Л. Современные подходы к профилактике пневмококковой инфекции // Медицинский совет. 2015. № 16. С. 64–67. [Kharit S.M., Perova A.L. Modern approaches to the prevention of pneumococcal infection. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2015, no. 16, pp. 64–67. (In Russ.)]
7. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: WHO manual. Geneva: World Health Organization, 2011. 311 p.

Авторы:

Подкопаев Я.В., младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Домотенко Л.В., к.х.н., зав. лабораторией разработки питательных сред ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Круглов А.Н., к.б.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией микробиологии Национального агентства клинической фармакологии и фармации, Москва, Россия;
Рябченко И.В., врач-бактериолог Национального агентства клинической фармакологии и фармации, Москва, Россия;
Детусhev К.В., младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Морозова Т.П., научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Шепелин А.П., д.б.н., зам. директора по научно-производственной работе ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Podkopaev Ya.V., Junior Researcher, Laboratory of Culture Medium Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Domotenko L.V., PhD (Chemistry), Head of the Laboratory of Culture Medium Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Kruglov A.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Microbiology, National Agency for Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow, Russian Federation;
Ryabchenko I.V., Bacteriologist, National Agency for Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow, Russian Federation;
Detushev K.V., Junior Researcher, Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Morozova T.P., Researcher, Laboratory of Culture Medium Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Shepelin A.P., PhD, MD (Biology), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.04.2016
 Отправлена на доработку 18.04.2016
 Принята к печати 30.05.2016

Received 11.04.2016
 Revision received 18.04.2016
 Accepted 30.05.2016

БЫСТРЫЙ СКРИНИНГ МОЧИ НА БАКТЕРИУРИЮ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА, СОВМЕЩАЮЩЕГО В СЕБЕ МЕТОДЫ ФОТОМЕТРИИ И КОГЕРЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ НЕФЕЛОМЕТРИИ

А.С. Гурьев^{1,4}, О.Ю. Кузнецова², М.Ф. Пясецкая³, И.А. Смирнова³, Н.А. Беляева³, В.Н. Вербов², А.Ю. Волков^{1,4}

¹ ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³ Детская городская клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия

Резюме. Одним из самых распространенных микробиологических исследований в клинической практике является посев мочи на бактериурию, причем до 80% образцов мочи оказываются отрицательными. В настоящей работе показана применимость метода когерентной флукуационной нефелометрии (КФН) для быстрого скрининга мочи у детей и выявления отрицательных образцов с целью уменьшения нагрузки на микробиологическую лабораторию. Было исследовано 205 образцов детской мочи параллельно при помощи посева и КФН-анализатора. В сравнении с посевом чувствительность метода КФН — 94,5%, специфичность — 85,3%, негативное прогностическое значение — 97,7%, позитивное прогностическое значение — 70,3%. В проведенном исследовании метод КФН позволил выявить 85,3% отрицательных образцов мочи (63,9% всех исследованных образцов) за 4 часа, сохранив 94,5% положительных образцов для дальнейшего посева. При этом ни один образец мочи с обсемененностью $\geq 10^4$ КОЕ/мл не был пропущен.

Ключевые слова: когерентная флукуационная нефелометрия, бактериурия, скрининг, моча, дети, микробиологический анализатор.

RAPID URINE SCREENING FOR BACTERIURIA IN CHILDREN USING MICROBIOLOGY ANALYZER, COMBINING PHOTOMETRIC AND COHERENT FLUCTUATION NEPHELOMETRIC METHODS

Gur'ev A.S.^{a,d}, Kuznetsova O.Yu.^b, Pyasetskaya M.F.^c, Smirnova I.A.^c, Belyaeva N.A.^c, Verbov V.N.^b, Volkov A.Yu.^{a,d}

^a Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

^c N.F. Filatov Children's City Clinical Hospital No. 5, St. Petersburg, Russian Federation

^d Medtechnopark LTD, Moscow, Russian Federation

Abstract. One of the most widespread microbiological analyses in clinical practice is urine culture, and up to 80% of urine samples turn out to be negative. In this study we demonstrate applicability of coherent fluctuating nephelometry (CFN)

Адрес для переписки:

Гурьев Александр Сергеевич
125315, Москва, ул. Усиевича, 23-81.
Тел.: 8 985 417-27-70. Факс: 8 (499) 129-47-30.
E-mail: coherneph@mail.ru

Contacts:

Alexander S. Gur'ev
125315, Russian Federation, Moscow, Usievicha str., 23-81.
Phone: +7 985 417-27-70. Phone/fax: +7 (499) 129-47-30.
E-mail: coherneph@mail.ru

Библиографическое описание:

Гурьев А.С., Кузнецова О.Ю., Пясецкая М.Ф., Смирнова И.А., Беляева Н.А., Вербов В.Н., Волков А.Ю. Быстрый скрининг мочи на бактериурию у детей с использованием микробиологического анализатора, совмещающего в себе методы фотометрии и когерентной флукуационной нефелометрии // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 395–398. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-395-398

Citation:

Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Pyasetskaya M.F., Smirnova I.A., Belyaeva N.A., Verbov V.N., Volkov A.Yu. Rapid urine screening for bacteriuria in children using microbiology analyzer, combining photometric and coherent fluctuation nephelometric methods // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 395–398. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-395-398

© Гурьев А.С. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-4-395-398>

method for rapid urine screening and negative samples identification for the purpose of reducing the workload of microbiological laboratory. 205 urine samples were tested by conventional culture method (CCM) and using CFN-analyzer. The agreement between CCM and CFN was 87.8%. Compared to CCM, CFN demonstrated sensitivity — 94.5%, specificity — 85.3%, negative predictive value — 97.7%, positive predictive value — 70.3%. In this study CFN-analyzer allowed to identify 85.3% of negative urine samples (63.9% of all tested samples) within 4 hours, and 94.5% of positive samples were retained for later CCM. Moreover none of samples with count $\geq 10^4$ CFU/ml was omitted.

Key words: coherent fluctuation nephelometry, bacteriuria, screening, urine, children, microbiology analyzer.

Введение

Инфекции мочевых путей (ИМП) — одни из самых распространенных инфекционных заболеваний в медицинской практике. Среди всех заболеваний инфекционной этиологии у детей ИМП занимают второе место после ОРВИ. Посев мочи на плотную среду является наиболее распространенным методом лабораторной диагностики ИМП. Поскольку при скрининговых исследованиях 70–80% образцов мочи по результатам посева отрицательны, быстрый скрининговый метод, обеспечивающий выявление отрицательных образцов, может значительно сократить временные и материальные затраты на бактериологические посевы [1, 2].

Из-за низкой распространенности автоматизированных микробиологических анализаторов в микробиологической лабораторной практике, разработка надежного, простого, недорогого микробиологического анализатора является актуальной задачей.

В большинстве анализаторов, в основу которых положена регистрация кривой роста микроорганизмов, используется оптический метод фотометрии (например, Vitek 2 [4]). В последние годы в клинической микробиологии все шире начинает применяться оптический метод нефелометрии, обладающий преимуществом в чувствительности перед широко применяемой фотометрией [2]. Используемый в настоящей работе метод когерентной флуктуационной нефелометрии (КФН) имеет ряд преимуществ перед традиционной нефелометрией. Он прост в исполнении, нечувствителен к оптическим засветкам и качеству кювет. КФН позволяет надежно регистрировать бактериальный рост, начиная с концентрации 10^3 – 10^4 КОЕ/мл, и проводить измерение низких мутностей даже при невысоком качестве кювет. Метод КФН применен для скрининга мочи на бактериурию у взрослых людей [1].

Цель данной работы — показать применимость КФН в клинической лабораторной практике для быстрого скрининга мочи на бактериурию у детей путем анализа кривых роста микрофлоры мочи. Задача скрининга — выявление и исключение отрицательных образцов мочи для уменьшения количества посевов в микробиологических лабораториях.

Материалы и методы

В исследовании использовались 12-канальные анализаторы «КФН-Ф-12» (разработаны и предоставлены ООО «Медтехнопарк»). Анализаторы «КФН-Ф-12» рассчитаны на одновременное измерение мутности в 12-ти кюветах. Для каждой кюветы осуществляется одновременная регистрация флуктуаций интенсивности рассеянного под малым углом света (КФН) и фотометрическая регистрация интенсивности прошедшего света (Ф). Совмещение двух методов позволяет расширить диапазон измеряемых концентраций бактерий до 10^3 – 10^9 КОЕ/мл, при этом КФН обеспечивает измерение низких концентраций бактерий, а фотометрия — высоких. Кюветы в анализаторах подвергаются несимметричному нагреву до 37°C, таким образом, чтобы обеспечить эффективное конвективное перемешивание жидкости в кюветах, необходимое для реализации метода КФН.

В настоящей работе использовались стандартные одноразовые фотометрические полумикрокюветы объемом 1 мл, которые герметично укупоривались одноразовыми ПЭ пробками («LP ITALIANA SPA», Италия).

В ходе работы были исследованы 214 образцов мочи в микробиологической лаборатории детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова (Санкт-Петербург).

При помощи анализатора «КФН-Ф-12» регистрировали кривые роста микрофлоры мочи, при этом анализируемым параметром выступало время задержки микробного роста. Известно [1], что в положительных (по результатам посева) образцах мочи рост будет наблюдаться раньше, а в отрицательных — позже, вследствие чего можно выбрать временной порог, позволяющий выявлять отрицательные образцы мочи, при этом, не идентифицировав ошибочно положительные образцы.

Результаты, полученные на анализаторе, сравнивали с результатами микробиологического посева тех же образцов мочи.

Определить точные численные показатели значимой бактериурии у детей, которые можно было бы применять во всех ситуациях, не представляется возможным; в качестве оценочного критерия истинной бактериурии используется показатель $\geq 10^4$ КОЕ/мл [3].

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ (ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПОСЕВА) ОБРАЗЦОВ ПО ВРЕМЕНИ ЗАДЕРЖКИ МИКРОБНОГО РОСТА (НА АНАЛИЗАТОРЕ «КФН-Ф-12»)

| Распределение образцов мочи по результатам посева | Группы образцов мочи | Распределение образцов мочи по задержке микробного роста на «КФН-Ф-12» | |
|---|----------------------|--|------------|
| | | T > 4 ч | T ≤ 4 ч |
| Нет роста — 91 шт. | А | 89 (97,8%) | 2 (2,2%) |
| Контаминация — 59 шт. | Б | 39 (66,1%) | 20 (33,9%) |
| Сомнительные (10 ³ КОЕ/мл) — 19 шт. | В | 3 (15,8%) | 16 (84,2%) |
| Слабоположительные (10 ⁴ КОЕ/мл) — 22 шт. | Г | 0 (0%) | 22 (100%) |
| Сильноположительные (10 ⁵ КОЕ/мл) — 14 шт. | Д | 0 (0%) | 14 (100%) |
| Всего — 205 шт. | А+Б+В+Г+Д | 131 (63,9%) | 74 (36,1%) |
| Отрицательные — 150 шт. | А+Б | 128 (85,3%) | 22 (14,7%) |
| Положительные (≥ 10 ³ КОЕ/мл) — 55 шт. | В+Г+Д | 3 (5,5%) | 52 (94,5%) |

Для оценки прогностической значимости метода скрининга мочи на анализаторе «КФН-Ф-12» использовали следующие показатели: чувствительность (доля положительных образцов, сохраненных для дальнейшего микробиологического исследования); специфичность (доля выявленных на КФН отрицательных образцов); ППЗ — позитивное прогностическое значение (вероятность того, что образец, положительный по результатам измерения методом КФН, окажется положительным по результатам посева); НПЗ — негативное прогностическое значение (вероятность того, что образец, отрицательный по результатам измерения методом КФН, окажется отрицательным по результатам посева).

В исследовании использовали мочу, собранную не ранее чем за 2 часа до анализа. 5 мл мочи помещали в стерильную пробирку и центрифугировали для осаждения крупных оптических примесей (клетки, слизь, соли), вносящих неспецифическую мутность. Режим центрифугирования (1700g, 60 с) был выбран так, чтобы крупные рассеивающие частицы оседали на дно пробирки, а микроорганизмы оставались в надосадочной жидкости. Затем из пробирок отбирали 0,7 мл надосадка. В первую кювету помещали 0,5 мл надосадка центрифугированной мочи и 0,5 мл сахарного мясоептонного бульона и регистрировали время задержки микробного роста. Во вторую кювету помещали 0,15 мл надосадка мочи и 0,85 мл бульона для оценки ингибирующего действия остаточных АБ или других примесей в моче (если при большем разведении мочи рост микрофлоры фиксируется значительно раньше, то это свидетельствует о наличии АБ или других ингибирующих рост примесей в образце мочи). Обе кюветы помещали в анализатор и регистрировали кривые роста микроорганизмов в течение 5–7 часов.

Результаты

В 9 из 214 исследованных образцов мочи зарегистрировано ингибирующее действие АБ или других примесей, эти образцы исключены

из статистики. Из оставшихся 205 образцов мочи по результатам микробиологического посева 55 (26,8%) были положительными (14 сильноположительных — 10⁵ КОЕ/мл, 22 слабоположительных — 10⁴ КОЕ/мл, 19 сомнительных — 10³ КОЕ/мл) и 150 (73,2%) — отрицательными (59 — вероятная контаминация (< 10³ КОЕ/мл; ≤ 10⁴ КОЕ/мл для лактобактерий), 91 — нет роста). Результаты типирования культур в положительных образцах: *Enterococcus* spp. — 32, колиморфные — 17, *Staphylococcus* spp. — 7, *Corynebacterium* spp. — 6, *Candida* spp. — 2, *Pseudomonas* spp. — 1, *Proteus* spp. — 1.

По результатам регистрации микробного роста на анализаторе «КФН-Ф-12» анализировали параметр задержки роста от момента смешения бульона и надосадка центрифугированной мочи.

Для достижения наилучшей статистической корреляции результатов микробиологического посева и регистрации микробного роста на анализаторе «КФН-Ф-12» было выбрано значение порога времени равное 4 часам. В соответствии с выбранным порогом по результату измерения задержки роста (Т) каждой пробы ей присваивали метку «наличие роста» (Т ≤ 4 часа) или «отсутствие роста» (Т > 4 часа). Результаты микробиологического посева (отрицательный/положительный) сравнивали с результатами измерения задержки микробного роста на анализаторе («наличие роста»/«отсутствие роста») (табл. 1). По результатам сравнения были вычислены прогностические значения метода скрининга мочи на КФН (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2. ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕТОДА СКРИНИНГА МОЧИ НА АНАЛИЗАТОРЕ «КФН-Ф-12»

| | |
|---|-------|
| Согласие | 87,8% |
| Чувствительность | 94,5% |
| Специфичность | 85,3% |
| ППЗ | 70,3% |
| НПЗ | 97,7% |
| Доля образцов, исключенных из потока материала на посев | 63,9% |

Обсуждение

Результаты проведенного исследования демонстрируют применимость анализатора на основе КФН для скрининга мочи на бактериурию у детей. Результаты, полученные при помощи КФН-анализатора и посева, совпадали на 87,8%. При помощи КФН возможно в течение 4 часов выявить и исключить 85,3% отрицательных образцов мочи, сохранив 94,5% положительных образцов для дальнейшего исследования при помощи посева, при этом ни один случай значимой бактериурии (обсемененность $\geq 10^4$ КОЕ/мл) не пропущен. Из общего количества образцов мочи, поступающих

на посев в микробиологическую лабораторию, метод позволяет изъять 63,9% образцов.

Простой, надежный, многоканальный комбинированный КФН-фотометрический анализатор позволяет значительно снизить количество посевов и получить отрицательный результат в день поступления мочи на исследование, что позволяет уменьшить нагрузку на бактериологическую лабораторию путем исключения отрицательных образцов мочи. Это позволяет сократить трудовые и временные затраты, что имеет значимый экономический эффект, поскольку бактериологическое исследование мочи является одним из самых широко применяемых в рутинной лабораторной практике.

Список литературы/References

1. Гурьев А.С., Волков А.Ю., Долгушин И.И., Поспелова А.В., Растопов С.Ф., Савочкина А.Ю., Сергиенко В.И. Когерентная флуктуационная нефелометрия — быстрый метод скрининга мочи на микробную обсемененность // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 1. С. 120–123. [Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Dolgushin I.I., Pospelova A.V., Rastopov S.F., Savochkina A.Yu., Sergienko V.I. Coherent fluctuation nephelometry: a rapid method for urine screening for bacterial contamination. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 159, no. 1, pp. 120–123. (In Russ.)]
2. Колясникова Н.М., Тиванова Е.В., Тимошина О.Ю., Станкевич Д.С., Матосова С.В. Бактериологический посев мочи за 4 часа с применением метода лазерного светорассеяния: сравнение с традиционным посевом на чашки Петри // Поликлиника. 2015. Т. 1, № 6 (1). С. 85–88. [Kolyasnikova N.M., Tivanova E.V., Timoshina O.Yu., Stankevich D.S., Matosova S.V. Bacteriological urine culture for 4 hours using the method of laser light scattering: a comparison with traditional sowing on petri dishes. *Poliklinika = Polyclinic*, 2015, vol. 1, no. 6 (1), pp. 85–88. (In Russ.)]
3. Эрман М.В. Инфекция мочевой системы // Детская медицина Северо-Запада. 2011. Т. 2. № 1. С. 61–67. [Erman M.V. Infection of urinary tract. *Detskaya meditsina Severo-Zapada = Children's Medicine of North-West*, 2011, vol. 2, no. 1, pp. 61–67. (In Russ.)]
4. Ligozzi M., Bernini C., Bonora M.G., De Fatima M., Zuliani J., Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 5, pp. 1681–1686.

Авторы:

Гурьев А.С., магистр ф.-м.н., младший научный сотрудник лаборатории медицинских нанотехнологий отдела биофизики ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ; научный сотрудник ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия;

Кузнецова О.Ю., магистр биотехнологии, младший научный сотрудник лаборатории нанотехнологий отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Пясецкая М.Ф., врач-бактериолог клинико-диагностической лаборатории ДГКБ № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Смирнова И.А., врач-бактериолог клинико-диагностической лаборатории ДГКБ № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Беляева Н.А., врач-бактериолог клинико-диагностической лаборатории ДГКБ № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Вербов В.Н., к.х.н., руководитель отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Волков А.Ю., к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинских нанотехнологий отдела биофизики ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ; генеральный директор ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия.

Authors:

Gur'ev A.S., Master (Physics and Mathematics), Researcher, Laboratory of Nanotechnology in Medicine, Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine; Researcher, Medtechnopark LTD, Moscow, Russian Federation;

Kuznetsova O.Yu., Master of Science in Biotechnology, Researcher, Laboratory Of Nanotechnology, Department Of New Technology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia.

Pyasetzkaya M.F., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, N.F. Filatov Children's City Clinical Hospital No. 5, St. Petersburg, Russian Federation;

Smirnova I.A., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, N.F. Filatov Children's City Clinical Hospital No. 5, St. Petersburg, Russian Federation;

Belyaeva N.A., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, N.F. Filatov Children's City Clinical Hospital No. 5, St. Petersburg, Russian Federation;

Verbov V.N., PhD (Chemistry), Head of the Department of New Technology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Volkov A.Yu., PhD (Physics and Mathematics), Senior Researcher, Laboratory of Nanotechnology in Medicine, Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine; Director of Medtechnopark LTD, Moscow, Russian Federation.

К 75-ЛЕТИЮ ГАЛИНЫ ЯКОВЛЕВНЫ ЦЕНЕВОЙ



Галина Яковлевна Ценева родилась в городе Тайшет Иркутской области в 1941 г. Пример старшей сестры, Александры, повлиял на выбор специальности Галиной Яковлевной: после успешного окончания школы она стала студенткой Иркутского медицинского института. После окончания института Г.Я. Ценева была направлена на кафедру эпидемиологии к профессору В.А. Башенину. Ее научным руководителем стал заведующий кафедрой профессор Д.В. Виноградов-Волжинский. Именно он направил Галину Яковлевну в Ленинградский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и познакомил с уже известным научным сотрудником А.Б. Дайтером, возглавлявшим изучение проблем риккетсиозов в нашей стране. Для сбора материала по теме исследования Галина Яковлевна отправляется в Алтайский край и Сибирь в составе научных экспедиций Института географии и Иркутского ИЭМ. Удача расшифровать природный очаг Ку-лихорадки пришла лишь на втором году экспедиции: был изолирован возбудитель, установлены его резервуары — грызуны-аборигены. Результатом аспирантской работы в 1970 г. стала кандидатская диссертация на тему: «Изучение взаимоотношений между риккетсиями Бернета и клещем *D. nuttali* как возможным переносчиком лихорадки Ку».

С 1969 по 1976 гг. Г.Я. Ценева работает в Иркутском государственном медицинском институте в качестве ассистента кафедры эпидемиологии и паразитологии и преподает эпидемиологию студентам-медикам.

В 1976 г. по приглашению на тот момент уже заведующего отделом природноочаговых и паразитарных инфекций профессора А.Б. Дайтера Галина Яковлевна возвращается в Ленинградский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, поступает на должность младшего научного сотрудника и переезжает с семьей в Ленинград. В этот период были начаты первые работы по изучению патогенных свойств иерсиний псевдотуберкулеза, клебсиелл, риккетсий и вызываемых ими патологических процессов, а также возбудителей паразитарных болезней, моделированию инфекционных процессов, разработке и созданию новых средств диагностики псевдотуберкулеза. В 1988 г. Галина Яковлевна успешно защищает докторскую диссертацию на тему «Биология возбудителя, вопросы патогенеза и иммунодиагностика псевдотуберкулеза».

В апреле 1993 г. по инициативе заместителя директора института профессора Ф.С. Носкова при институте создается лаборатория бактериальных капельных инфекций, руководителем которой становится Галина Яковлевна Ценева. В 1994 г. Г.Я. Ценева присуждено ученое звание профессора по специальности «микробиология». В этом же году она становится действительным членом Петровской академии наук и искусств по специальности «микробиология».

В связи с возникшей в эти годы масштабной эпидемией дифтерии, важным направлением работы Галины Яковлевны и ее учеников явилось изучение биологических свойств возбудителя дифтерии, иммунитета к инфекции, эпидемических особенностей ее распространения и совершенствование методов мониторинга за дифтерией. В последнее десятилетие в структуре заболеваемости детей инфекциями, управляемыми вакцинопрофилактикой, ведущее место стал занимать коклюш. В этой связи встал вопрос о необходимости изучения возможных генетических мутаций и, как следствие, изменения биологических свойств возбудителя, что могло явиться причиной снижения эффективности вакцинопрофилактики. Актуальным также являлся поиск путей повышения эффективности диагностики. Решение указанных задач стало еще одним направлением научно-практической деятельности Г.Я. Ценовой и возглавляемой ею лаборатории.

Приоритетным для Г.Я. Ценовой являлась разработка комплексного подхода к оценке вирулентности возбудителей ряда инфекций, основанного на применении набора адекватных экспериментальных моделей, тестов, критериев. Этими фундаментальными исследованиями внесен существенный вклад в теорию о вирулентности бактерий и научно обоснован перевод ряда представителей бактерий из IV в III группу патогенности. Методологическая основа нового подхода к оценке вирулентности бактерий представлена в главах учебника «Частная эпидемиология» (СПб., 1993), в монографии «Иерсиниозы» (М., 2003).

Галиной Яковлевной и ее учениками исследован ряд вопросов патогенеза псевдотуберкулеза и иерсиниоза, клебсиеллеза и других инфекций; вскрыты механизмы хронического и рецидивирующего их течения, обоснована разработка иммунологического направления в диагностике иерсиниозов.

Впервые в России получены новые молекулярно-генетические характеристики бордетелл, коринебактерий, иерсиний псевдотуберкулеза, усовершенствованы методы их индикации и идентификации; определены рибо- и патотипы иерсиний, в том числе специфичные для России, и уточнена их роль в патогенезе псевдотуберкулеза. Установлена связь доминантной циркуляции новых ДНК-типов бордетелл с заболеваниями коклюшем привитых детей, усовершенствована тактика контроля иммунитета к дифтерии и коклюшу, обоснована определяющая роль в поствакцинальном иммунитете высокоавидных антител.

На основе иммунологических и генетических подходов созданы новые диагностические препараты, а также питательные среды, схемы индикации и идентификации ряда возбудителей инфекции, разработаны диагностические препараты (12 диагностических препаратов и среды 42 наименований, утверждено 6 технологий производства).

Научная продукция Г.Я. Ценовой значительна: она представлена в различных изданиях, на международных конференциях в 20 странах мира. Ею опубликовано более 370 научных работ, в том числе четверть из них – за рубежом, издано 36 научно-методических трудов, в том числе 6 монографий.

Г.Я. Ценева являлась руководителем 24-х диссертационных работ, в том числе 5 докторских. Галина Яковлевна с 2008 по 2015 гг. возглавляла Референс-центром по мониторингу за иерсиниозами, оказывала методическую помощь специалистам всех субъектов Российской Федерации по данной проблеме, трижды организовывала Всероссийские конференции с международным участием по иерсиниозам. С 2011 по 2015 гг. Г.Я. Ценева входила в состав редакционного совета журнала «Инфекция и иммунитет».

Г.Я. Ценева отмечена рядом наград и званий. Она — отличник здравоохранения (1998); заслуженный деятель науки Российской Федерации (2006); награждена юбилейными медалями Санкт-Петербурга и золотой медалью Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «За практический вклад в укрепление здоровья нации» (2008), нагрудным знаком «Почетный работник Роспотребнадзора» (2015).

Сотрудники Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, коллектив лаборатории медицинской бактериологии Института, а также редколлегия журнала «Инфекция и иммунитет» поздравляют Галину Яковлевну Ценеву со знаменательной датой и желают здоровья и благополучия.

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. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

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, kDa 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. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. 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. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (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, в любом месте 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, 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 www.e-library.ru . 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://iimmun.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.agrk.org — индекс 41392.
 Цена свободная.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

| | | | |
|-----------------------|-----|-----------------------|----------|
| Аль-Шехадат Р.И. | 345 | Лаврентьева И.Н. | 353 |
| Андреева Н.В. | 379 | Лаптева А.М. | 366 |
| Антипова А.Ю. | 353 | Мадай Д.Ю. | 335 |
| Афиногенов Г.Е. | 335 | Малахов И.С. | 345 |
| Афиногенова А.Г. | 335 | Махиня О.В. | 384 |
| Беляева Н.А. | 395 | Морозова Т.П. | 389 |
| Бичурина М.А. | 353 | Останкова Ю.В. | 359 |
| Буаро М.И. | 353 | Подкопаев Я.В. | 389 |
| Буркитбаев Ж.К. | 359 | Полищук Н.Н. | 325 |
| Вербов В.Н. | 395 | Попова А.Ю. | 353 |
| Волков А.Ю. | 395 | Пясецкая М.Ф. | 395 |
| Ворошилова Т.М. | 335 | Ракитина Е.Л. | 384 |
| Галяс В.А. | 384 | Рябченко И.В. | 389 |
| Гурьев А.С. | 395 | Савчук Т.Н. | 359 |
| Детушев К.В. | 389 | Санникова И.В. | 384 |
| Домотенко Л.В. | 389 | Саркисян Н.С. | 384 |
| Духовлинов И.В. | 345 | Свистунов С.А. | 373 |
| Жарков Д.А. | 373 | Семенов А.В. | 359 |
| Железнова Н.В. | 353 | Симбирцев А.С. | 345 |
| Ивашенко В.Д. | 379 | Смирнова И.А. | 395 |
| Камышный А.М. | 325 | Смирнова С.В. | 366 |
| Ковалевич Н.И. | 384 | Суборова Т.Н. | 373 |
| Кожухова Е.А. | 379 | Тотолян Арег А. | 353, 359 |
| Коленчукова О.А. | 366 | Шепелин А.П. | 389 |
| Круглов А.Н. | 389 | Шпынов С.Н. | 315 |
| Кузин А.А. | 373 | Щербакова С.А. | 353 |
| Кузнецова О.Ю. | 395 | | |

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

| | | | |
|--|-----|--|-----|
| ассоциации возбудителей | 373 | металло-бета-лактамаза | 335 |
| ассоциация энтеропатогенов | 379 | метод «шахматной доски» | 335 |
| бактериурия | 395 | микробиологическая диагностика и мониторинг ... | 373 |
| безопасность крови | 359 | микробиологический анализатор | 395 |
| белки острой фазы воспаления | 384 | микробиом кишечника | 325 |
| белок E7 | 345 | микробиоценоз | 366 |
| белок L2 | 345 | митохондрия | 315 |
| бисфосфонаты | 335 | молекулярная эпидемиология | 359 |
| бруцеллез | 384 | моча | 395 |
| вакцина ВПЧ | 345 | острая диарея | 379 |
| видовая принадлежность | 366 | папиллома | 345 |
| вирулентность | 366 | персистенция | 366 |
| вирус папилломы человека | 345 | питательные среды | 389 |
| ГБМ-агар | 389 | полимеразная цепная реакция | 379 |
| Гвинейская Республика | 353 | полипозный риносинусит | 366 |
| гепатит В | 359 | порядок <i>Rickettsiales</i> | 315 |
| группа MALOs (midichloria and like organisms) | 315 | программа элиминации | 353 |
| дети | 395 | раненые и пострадавшие | 373 |
| диагностика | 384 | резистентность | 366 |
| доноры крови | 359 | секвенирование | 359 |
| желчные кислоты | 325 | селективные добавки | 389 |
| заболеваемость | 353 | скрининг | 395 |
| иксодовые клещи | 315 | уровень IgG-антител | 353 |
| иммунитет | 325 | фолдинг | 345 |
| иммунный ответ | 384 | хирургический стационар | 373 |
| иммунопатогенез | 384 | хромогенные среды | 373 |
| иммуноферментный анализ | 379 | хронический гепатит | 325 |
| ингибиторы металло-бета-лактамазы | 335 | цирроз печени | 325 |
| инфекционные осложнения | 373 | цитокины | 384 |
| Казахстан | 359 | Шоколадный агар | 389 |
| карбапенемрезистентные грамотрицательные | | эндосимбионт | 315 |
| микроорганизмы | 335 | этидроновая кислота | 335 |
| когерентная флуктуационная нефелометрия | 395 | « <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii» | 315 |
| короткоцепочечные жирные кислоты | 325 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 389 |
| корь | 353 | HBsAg-положительные доноры | 359 |
| культуральный метод | 379 | <i>Ixodes ricinus</i> | 315 |
| лихорадка Эбола | 353 | <i>Neisseria meningitidis</i> | 389 |
| метаболизм | 325 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 389 |