

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

апрель–июнь

2017, том 7

№ 2

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

Макроусов 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 ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, 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 ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, 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

С 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

С 2017 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Scopus

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 23.05.2017 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 14.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1104

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2017
© НИИЭМ имени Пастера, 2017
© СПб РО РААКИ, 2017

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

April–June

2017, volume 7

No. 2

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

Igor 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, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, 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
- 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. Chereshevnev** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Director, Yekaterinburg, Russian Federation
- Andre Spiegel** PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Dakar, Director, Dakar, Senegal

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, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, 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

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus database

Editorial Office

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.

Phone/fax: (812) 232-07-42.

E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Beresta Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,

Koli Tomchaka str., 28.

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

Passed for printing 23.05.2017. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 14.

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

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2017

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2017

© SPb RAACI, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Шамсутдинова О.А.

ЖИВЫЕ АТТЕНУИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ	107
---	-----

Оригинальные статьи

Духовлинов И.В., Добровольская О.А., Орлов А.И.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Flu-Chim, СОДЕРЖАЩЕГО ОСНОВНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСОВ ГРИППА А И В	117
---	-----

Поляков Д.С., Антимонова О.И., Сахабеев Р.Г., Грудина Н.А., Ходова А.Е., Сеницына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ИММУНОГЕННОСТЬ СВЯЗАННОГО С НИМИ БЕЛКА	123
---	-----

Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Рутковская Н.В., Кондюкова Н.В., Одаренко Ю.Н., Казачек Я.В., Цепочкина А.В., Южалин А.Е., Барбараш Л.С., Барбараш О.Л.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА, ФОСФОРНОКАЛЬЦИЕВОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА НА РИСК РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ЭНДОКАРДИТА	130
--	-----

Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Кулова Е.А., Уткин О.В.

ВКЛАД РЕЦЕПТОРОВ CD95 И DR3 В АПОПТОЗ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ В ПЕРИОД РЕКОНВАЛЕСЦЕНЦИИ	141
--	-----

Васильева Е.В., Кудрявцев И.В., Максимов Г.В., Вербов В.Н., Серебрякова М.К., Ткачук А.П., Тотолян Арег А.

ВЛИЯНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛЕЗА НА СТЕПЕНЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	151
--	-----

Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Донских Е.Е., Пикина А.П., Кафарская Л.И., Афанасьев М.С., Караулов А.В.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ОЧАГОВ КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ	162
---	-----

Бессолицына Е.А., Волков С.А., Столбова Ф.С.

ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ БАКТЕРИЯМИ РОДА <i>VORRELI</i> И ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА КЛЕЩЕЙ, СОБРАННЫХ В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ	171
--	-----

Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В., Осовских В.В., Евтушенко В.И.

КАРБАПЕНЕМАЗА-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ В СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОМ СТАЦИОНАРЕ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА	181
--	-----

Костинов М.П., Черданцев А.П., Шмитько А.Д., Праулова Д.А., Протасов А.Д., Дагиль Ю.А., Костинова Т.А., Ахматова Н.К., Хромова Е.А., Рыжов А.А., Благовидов Д.А., Полищук В.Б., Магаршак О.О., Коровкина Е.С.

ИММУНОГЕННОСТЬ ИММУНОАДЬЮВАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА У БЕРЕМЕННЫХ	193
--	-----

Краткие сообщения

Куличенко А.Н., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТОВ <i>IN VITRO</i> ДЛЯ ОЦЕНКИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОТИВОЧУМНОГО ИММУНИТЕТА	203
--	-----

Правила для авторов	209
----------------------------------	-----

Авторский указатель	212
----------------------------------	-----

Предметный указатель	212
-----------------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Shamsutdinova O.A.

LIVE ATTENUATED VACCINES FOR THE IMMUNOPROPHYLAXIS	107
---	------------

Original articles

Dukhovlinov I.V., Dobrovolskaia O.A., Orlov A.I.

PRODUCTION OF HYBRID RECOMBINANT PROTEIN Flu-Chim, CONTAINING INFLUENZA VIRUSES A AND B MAJOR EPITOPES	117
---	------------

Polyakov D.S., Antimonova O.I., Sakhabeev R.G., Grudinina N.A., Khodova A.E., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M.

POLYLACTIC ACID NANOPARTICLES INFLUENCE ON IMMUNOGENICITY OF THE PROTEIN BOUND WITH THEM	123
---	------------

Ponassenko A.V., Kutikhin A.G., Khutornaya M.V., Rutkovskaya N.V., Kondyukova N.V., Odarenko Yu.N., Kazachek Ya.V., Tsepokina A.V., Yuzhalin A.E., Barbarash L.S., Barbarash O.L.

POLYMORPHISMS WITHIN INNATE IMMUNE RESPONSE, CALCIUM METABOLISM AND LIPID METABOLISM ARE PREDICTORS OF INFECTIVE ENDOCARDITIS.....	130
---	------------

Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Kulova E.A., Utkin O.V.

ROLE OF CD95 AND DR3 RECEPTORS IN NAÏVE T-LYMPHOCYTES APOPTOSIS IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS DURING CONVALESCENCE	141
---	------------

Vasileva E.V., Kudryavtsev I.V., Maximov G.V., Verbov V.N., Serebriakova M.K., Tkachuk A.P., Totolian Areg A.

IMPACT OF HIV INFECTION AND TUBERCULOSIS ON THE PERIPHERAL BLOOD T-CELL DIFFERENTIATION	151
--	------------

Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvircun O.V., Basov A.S., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S., Donskich E.E., Pikina A.P., Kafarskaya L.I., Afanasiev M.S., Karaulov A.V.

EFFECTIVENESS OF MOLECULAR-GENETIC DIAGNOSTICS DURING PERTUSSIS INFECTION FOCI EXAMINATION	162
---	------------

Bessolitsyna E.A., Volkov S.A., Stolbova F.S.

DYNAMICS OF TICKS' INFESTATION WITH <i>BORRELIA</i> GENUS BACTERIA AND TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN KIROV REGION	171
---	------------

Polischouk A.G., Jakubovich E.I., Poluhina O.V., Osovskich V.V., Evtushenko V.I.

CARBAPENEMASE-PRODUCING GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN A SPECIALIZED HOSPITAL OF ST. PETERSBURG	181
---	------------

Kostinov M.P., Cherdantsev A.P., Shmitko A.D., Praulova D.A., Protasov A.D., Dagil U.A., Kostinova T.A., Akhmatova N.K., Chromova E.A., Ryzhov A.A., Blagovidov D.A., Polishchuk V.B., Magarshak O.O., Korovkina E.S.

IMMUNOGENICITY OF ADJUVANT INFLUENZA VACCINE FOR PREGNANT WOMEN	193
--	------------

Short communications

Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V.

THE ANTIGEN-SPECIFIC CELL <i>IN VITRO</i> TESTS FOR POST-VACCINATION ANTIPLAGUE IMMUNITY FORMATION	203
---	------------

Instructions to Authors	209
--------------------------------------	------------

Author index	212
---------------------------	------------

Subject index	212
----------------------------	------------

ЖИВЫЕ АТТЕНУИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ

О.А. Шамсутдинова

ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, г. Сочи, Россия

Резюме. Обзор посвящен истории получения живых противовирусных вакцин и их применению для профилактики инфекционных заболеваний. Отмечено, что до начала XX века было разработано и внедрено в практику всего три живые вакцины — против натуральной оспы, бешенства, чумы. Открытие Д. Эндерсом, Т.Х. Уэллером и Ф.Ч. Робинсом способности вируса полиомиелита, а затем и ряда других вирусов, репродуцироваться *in vitro* в культурах клеток различных типов, значительно расширили исследования по получению аттенуированных штаммов вирусов для живых вакцин. Освещены исторические этапы получения и внедрения живых вакцин для профилактики натуральной оспы, полиомиелита, кори, краснухи, эпидемического паротита. Представлены аргументы в пользу применения ассоциированных вакцинных препаратов для профилактики вирусных инфекций. Описаны различные варианты стратегии и тактики применения живых вакцин, которые используются для специфической профилактики вирусных инфекций в разных странах. В обзоре приводятся сведения о технологических приемах получения противовирусных вакцин. Оценены публикации, свидетельствующие о развитии специфических реакций у привитых вакцинными штаммами вирусов кори, паротита, полиомиелита и краснухи, таких как асептические менингиты (вакцинные штаммы вируса эпидемического паротита), острые артриты (вакцинные штаммы вируса краснухи), температурные реакции, сыпь (вакцинные штаммы вируса кори), вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП) (вакцинные полиовирусы). Особо отмечено, что длительный опыт вакцинопрофилактики как в России, так и за рубежом, убедительно показывает, что риск развития поствакцинальных осложнений несоизмеримо ниже, чем риск причинения вреда здоровью от соответствующих инфекций. Заключается, что несмотря на внедрение в практику новых вакцин третьего и четвертого поколений, живые аттенуированные вакцины не утрачивают своей значимости и используются в вакцинопрофилактике управляемых инфекций как наиболее эффективные иммунобиологические препараты.

Ключевые слова: моновакцины, ассоциированные вакцины, живые вакцины, заболеваемость, вакцинные штаммы, полиомиелит, корь, краснуха, эпидемический паротит, вакцинопрофилактика.

LIVE ATTENUATED VACCINES FOR THE IMMUNOPROPHYLAXIS

Shamsutdinova O.A.

Institute of Medical Primatology, Sochi, Russian Federation

Abstract. The review focuses on the history of the production of live antiviral vaccines and their use for the prevention of infectious diseases. It was noted that before the beginning of the 20th century, only three live vaccines were developed and put into practice — against smallpox, rabies, plague. The discovery of D. Enders, T.H. Weller and F.Ch. Robins of the ability of the polio virus, and then of a number of other viruses, to reproduce *in vitro* in cell cultures of various types, greatly expanded the studies on the production of attenuated strains of viruses for live vaccines. The historical stages of obtaining and introducing live vaccines for the prevention of smallpox, poliomyelitis, measles, rubella, and

Адрес для переписки:

Шамсутдинова Ольга Анатольевна
354376, Россия, Краснодарский край, г. Сочи, Адлерский р-н,
с. Веселое, ул. Мира, 177, ФГБНУ НИИ медицинской
приматологии.
Тел.: (862) 243-20-28 (служебн.). Факс. (862) 243-20-28.
E-mail: shamsutdinova-o-a@yandex.ru

Contacts:

Olga A. Shamsutdinova
354376, Russian Federation, Krasnodar region, Sochi, Adler,
Veseloye village, 177 Mira str., FSBRI Institute
of Medical Primatology.
Phone: (862) 243-20-28 (office). Fax: (862) 243-20-28.
E-mail: shamsutdinova-o-a@yandex.ru

Библиографическое описание:

Шамсутдинова О.А. Живые аттенуированные вакцины для
иммунопрофилактики // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2.
С. 107–116. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-107-116

Citation:

Shamsutdinova O.A. Live attenuated vaccines for the immunoprophylaxis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017,
vol. 7, no. 2, pp. 107–116. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-107-116

mumps are highlighted. Arguments in favor of the use of associated vaccine preparations for the prevention of viral infections are presented. Various variants of the strategy and tactics of using live vaccines, which are used for specific prevention of viral infections in different countries, are described. The review provides information on technological methods for obtaining antiviral vaccines. The publications testifying to the development of specific reactions in immunized vaccine strains of measles, mumps, poliomyelitis and rubella viruses, such as aseptic meningitis (vaccine strains of mumps virus), acute arthritis (vaccine rubella virus strains), temperature reactions, rash (vaccine strains of the virus Measles), vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) vaccine vaccine poliovirus. It is particularly noted that the long experience of vaccine prevention both in Russia and abroad convincingly shows that the risk of developing post-vaccination complications is incommensurably lower than the risk of causing harm to health from the corresponding infections. It is concluded that despite introduction of new third and fourth generation vaccines into practice, live attenuated vaccines do not lose their significance and are used in vaccine-preventable infections as the most effective immunobiological drugs.

Key words: *monovaccines, associated vaccines, live vaccines, incidence, vaccine strains, poliomyelitis, measles, rubella, mumps, vaccine prophylaxis.*

Борьба с инфекционными заболеваниями с помощью вакцинопрофилактики, предложенной Эдвардом Дженнером в 1796 г., до настоящего времени остается одним из выдающихся достижений человечества в области медицины. Сегодня специфическая профилактика является наиболее мощным, безопасным и эффективным методом борьбы с инфекционными болезнями вирусной, бактериальной и паразитарной этиологии [15, 28, 41].

В настоящее время во всем мире используется несколько сотен вакцин как инактивированных, химических, рекомбинантных, так и живых, формирующих защиту против ряда инфекционных заболеваний (полиомиелита, кори, дифтерии, коклюша, столбняка, краснухи, бешенства и др.) [44, 50, 62]. Однако еще до начала прошлого столетия было разработано и внедрено в практику всего пять вакцин (живые вакцины против натуральной оспы, бешенства, чумы и инактивированные — против брюшного тифа и холеры) [9, 76]. Это связано, прежде всего, с тем, что многочисленные попытки определения этиологии заболевания людей неясной, но предположительно, инфекционной природы проводились на мелких лабораторных животных, не восприимчивых к большинству инфекционных патогенов человека [81]. Открытие Д. Эндерсом, Т.Х. Уэллером и Ф.Ч. Робинсом способности вируса полиомиелита расти в культурах различных типов тканей, значительно расширили вирусологические исследования по изучению и установлению этиологической роли различных возбудителей и получению штаммов различных вирусов в качестве основы для вакцин [9, 68]. Кроме того, открытие чувствительности некоторых видов обезьян ко многим возбудителям инфекционных болезней людей, определило использование низших приматов для экспериментального моделирования и изучения той или иной формы заболевания людей [22, 39].

Эпидемические вспышки полиомиелита, кори, краснухи, эпидемического паротита и брюшного тифа, прокатившиеся по странам Европы и Северной Америки во второй половине XX в.

определили развитие работ по созданию эффективных и безопасных вакцин [4, 23, 45, 78]. Уже к концу 60-х — началу 70-х гг. XX в. было разработано около 30 вакцин.

Так, исследования по созданию полиомиелитной вакцины приобрели особую актуальность после резко возросших в 1941–1945 гг. среднегодовых показателей заболеваемости полиомиелитом в скандинавских странах (24,4–27,2 на 100 000 населения) и в 1950–1955 гг. в США и Канаде (23,9–26,7 на 100 000 населения) [11, 65]. Успешными оказались два направления исследований: создание инактивированной вакцины и получение аттенуированных штаммов полиовируса в качестве основы для живой вакцины. Уже в 1955 г. после проведенных полевых испытаний, доказавших эффективность и безопасность вакцины, в США была лицензирована и введена в практику инактивированная полиовирусная вакцина (ИПВ) Дж.Е. Солка. В результате проведенной вакцинации детей в европейских странах и США было зарегистрировано снижение заболеваемости полиомиелитом [67]. Однако уже в первые годы применения ИПВ отмечена ее низкая иммуногенность и опасность заноса в вакцину из клеточного субстрата — первичных культур клеток почек обезьян макак-резус — обезьяньего вируса SV40, не инактивируемого формальдегидом по схеме, принятой для инактивации вируса полиомиелита [9, 51].

В СССР с 1957 по 1958 гг. для вакцинации детей против полиомиелита применяли ИПВ. С 1959 г. в СССР и странах Балтики массовую иммунизацию детей проводили живой оральной полиовирусной вакциной (ОПВ). Это связано с успешно проведенными полевыми испытаниями живой вакцины из штаммов Сэбина, проводившимися вначале 1959 г. в Латвии под руководством А.А. Смородинцева и в Литве и Эстонии под руководством М.П. Чумакова, показавшими безопасность, высокую иммунологическую и эпидемиологическую эффективность данной вакцины [34]. В этих исследованиях также было установлено, что размножение вакцинного вируса в кишечнике привитых и выделение его с но-

соглоточными отделениями, и особенно с фекалиями, создавало благоприятные условия для контактной передачи вируса в семьях, детских коллективах. Такое распространение вакцинного полиовируса приводило к контактной иммунизации части невакцинированного населения и повышению уровня коллективного противополиомиелитного иммунитета [9, 67]. В течение нескольких лет массовое применение ОПВ привело к резкому снижению заболеваемости полиомиелитом в большинстве республик СССР [11].

Аттенуированные штаммы полиовируса, предложенные Сэбином в качестве вакцинных штаммов, включали три типа вирусов полиомиелита: тип I — штамм LS-c,2ab, происходящий от штамма Mahoney; тип II — штамм P712,Ch,2ab, происходящий от штамма P712, и тип III — штамм Leon12a,b, происходящий от штамма Leon. Это определило создание и введение в практику моно-, двух- и трехкомпонентных вакцин. В ряде исследований было установлено, что вакцинация моновалентными полиовирусными вакцинами вызывает образование вируснейтрализующих антител к вирусу полиомиелита типа I у 89–97% привитых детей, типа II — у 95–98%, типа III — у 88–94%. Однако использование трех моновакцин и соблюдение последовательности их введения при проведении массовой иммунизации значительно осложняло организацию вакцинации [9, 74]. Именно поэтому для проведения массовой иммунизации в СССР с 1960 г., а в США с 1963 г. было рекомендовано применение трехвалентной вакцины. Поскольку проведенные клинические и полевые испытания установили, что однократная вакцинация трехвалентной живой ОПВ не обеспечивает формирования иммунитета к трем типам вируса полиомиелита, была предложена трехкратная иммунизация детей [75]. При проведении массовых испытаний трехвалентной вакцины, содержащей в прививочной дозе 10^6 инфекционных единиц типа I, 10^5 — типа II и $10^{5,8}$ — типа III, была установлена высокая иммуногенность вакцины. При этом после первой прививки защитный уровень антител к вирусу полиомиелита типа I наблюдался у 39–82% вакцинированных, к типу II — у 78–84%, к типу III — у 71%; после второй вакцинации — у 92, 100 и 96% привитых соответственно; после третьей прививки — у 97, 100 и 100% вакцинированных соответственно. В связи с этим ВОЗ рекомендовала данный состав для изготовления живой оральной полиовирусной вакцины [9].

Еще одной широко и успешно применяющейся и по настоящее время живой вакциной является живая коревая вакцина (ЖКВ) на основе различных аттенуированных штаммов вируса кори. В США и странах Европы массовую вакцинацию против кори стали проводить с 1963 г., в СССР — с 1967 г., что привело к резкому снижению заболеваемости [43]. Так, в европейских

странах иммунизация населения против кори позволила в 5000–10 000 раз снизить заболеваемость по сравнению с довакцинальным периодом, облегчить течение болезни. Расчетное количество смертей от кори в мире за период 2000–2010 гг. снизилось на 76% [48, 64]. В СССР уже через 5 лет применения вакцины для плановой вакцинации против кори заболеваемость снизилась в 6 раз по сравнению со средним показателем за предшествующие 10 лет. [8]. В настоящее время в России реализуется стратегический план ВОЗ по элиминации эндемичной кори в Европейском регионе [7, 14, 65].

В разных странах мира для серийного производства ЖКВ применяют различные вакцинные штаммы вируса кори (Schwarz, More-attenuated Enders, Edmonston B, Edmonston-Zagreb, CAM 70, TD 97 и Л-16) [1]. На территории РФ используют в основном отечественную ЖКВ на основе вакцинного штамма вируса кори Ленинград-16 (Л-16). Аттенуированный штамм вируса кори Л-16 был получен в НИИЭМ им. Пастера (Л.Ю. Тарос) под руководством академика А.А. Смородинцева в 1960 г. [36]. Крупносерийное производство ЖКВ из штамма Л-16 в нашей стране было освоено в конце 60-х гг. XX в. в НИИ вирусных препаратов им. О.Г. Анджaparидзе РАМН совместно с НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Уже в первые годы применения ЖКВ была отмечена ее высокая иммуногенность и эпидемиологическая эффективность [8]. Показано, что вакцинация детей в возрасте 12 месяцев ЖКВ из штамма Л-16 вызывает образование вируснейтрализующих антител к кори у 95% привитых, и защитные титры антител сохраняются в течение ряда лет [29]. Отечественная ЖКВ из штамма Л-16 была признана ВОЗ препаратом, отвечающим мировым стандартам, и экспортировалась во многие страны мира: Польшу, Болгарию, Венгрию, Румынию, Турцию и Кубу [43].

Основным отличием отечественной ЖКВ из штамма Л-16 от всех лицензированных на территории РФ импортных коревых вакцин, явилось использование в качестве субстрата культуры фибробластов эмбрионов японских перепелов, что исключает риск возникновения анафилактических реакций на куриный белок при развитии гиперчувствительности немедленного типа. Также в настоящее время известно значительное количество публикаций, свидетельствующих об обнаружении ревертазной активности в живых вирусных вакцинах, приготовленных на культуре клеток куриных эмбрионов. Показано, что ревертазная активность обусловлена наличием последовательностей птичьих ретровирусов в культуре клеток куриных эмбрионов, использующихся для серийного производства живых вирусных вакцин [9, 29, 43].

С 1998 г. на территории России используют двукратную иммунизацию ЖКВ на первом году жизни детей обоим пола с введением вто-

рой дозы вакцины в шесть лет. Ревакцинация ЖКВ обеспечивает дополнительную иммунизацию детей, для которых первичная вакцинация оказалась недостаточной [14, 39]. Это связано прежде всего с тем, что введение второй дозы вакцины позволяет повысить популяционный иммунитет, предотвратить угасание поствакцинального иммунитета, а также элиминировать возбудитель кори.

В других странах мира используют иные стратегии вакцинопрофилактики, чаще всего — массовую иммунизацию детей в виде «туровой» в возрасте от 1 года до 12 лет. Так, в странах Южной Америки и Карибского бассейна прекратили циркуляцию местных штаммов вируса кори путем проведения дополнительной массовой вакцинации всех детей в возрасте от 9 месяцев до 14 лет с последующей рутинной иммунизацией всех вновь рождающихся детей. Несколько позже аналогичная тактика иммунизации применялась в США и Канаде, где заболеваемость эндемичной корью почти полностью исчезла [9, 43, 83].

Эпидемический паротит (ЭП), так же как корь, краснуху и полиомиелит, относят к управляемым инфекциям, и вакцинопрофилактика признана во всем мире наиболее эффективным и безопасным методом борьбы с этой антропонозной вирусной инфекцией [15, 32, 39]. Первую эпидемию ЭП в России описал Д. Блюм еще в 1829 г. в Санкт-Петербурге. И только в 1934 г. К. Джонсон и Э. Гудпасчер смогли доказать вирусную этиологию этого заболевания введением в выводной проток слюнной железы обезьян профильтрованной через бактериальный фильтр слюны больного [9].

Активная иммунизация против ЭП в нашей стране проводится с 1981 г. [15, 27]. Однако первые попытки создания живой паротитной вакцины были предприняты еще в середине 50-х гг. XX столетия, как в США, так и в СССР. Первые живые паротитные вакцины (ЖПВ) из штамма СК приготовленные на куриных эмбрионах оказались реактогенными при внутрикожном введении и не нашли широкого применения в практике здравоохранения. Наиболее перспективной оказалась работа А.А. Смородинцева и М.Н. Насибова в НИИЭМ им. Пастера по получению аттенуированного вакцинного штамма вируса паротита Ленинград-3 (Л-3) [38]. Исследования по адаптации вакцинного штамма Л-3 к культуре фибробластов эмбрионов японских перепелов показали, что происходит снижение реактогенности, однако при этом не изменяется антигенная активность вакцинного штамма. Также было установлено, что использование культуры фибробластов эмбрионов японских перепелов для производства ЖПВ из штамма Л-3 устраняет риск возникновения анафилактических реакций гиперчувствительности немедленного типа на куриный белок.

Специфическая профилактика эпидемического паротита в Европе, Северной Америке и в других странах мира также проводится ЖПВ на основе штаммов Enders и RIT 43/85 производных от штамма Jeryl Lynn и Л-Загреб аттенуированных на культуре клеток куриного эмбриона. В ходе многочисленных исследований, установлена высокая иммуногенность данных штаммов. Антитела к вирусу эпидемического паротита в защитных титрах были отмечены у 96% привитых [9, 25, 65].

В Национальном календаре профилактических прививок с 1998 г. регламентировано двукратное введение ЖПВ: первой дозы — в 12 месяцев, а второй — в 6 лет. По данным ранее проведенных исследований ЖПВ из штамма Л-3 обеспечивает сероконверсию у 92–95% вакцинированных детей в возрасте 12 месяцев, при этом максимальный уровень антипаротитных антител достигается через 6–7 недель после вакцинации [25]. Особый интерес представляют материалы по изучению назальных смывов иммунизированных ЖПВ из штамма Л-3, которые показали, что ревакцинация ЖПВ приводит к появлению IgA — дополнительной противовирусной защите при воздушно-капельных инфекциях, что служит еще одним доказательством иммунологической эффективности ревакцинации [39].

Краснуха — нетяжелое инфекционное заболевание, особенностями которого является повсеместное распространение и тератогенность возбудителя. По данным различных авторов краснушная внутриутробная инфекция приводит не только к выкидышам и мертворождению, но нередко и к тяжелым поражениям плода [10, 12, 47, 80]. Первые подробные описания типичных для врожденной краснухи аномалий развития (глухота, слепота и врожденные пороки сердца) были сделаны офтальмологом Н. Греггом в 1941 г. [2, 18]. Так, в США и Канаде во время эпидемии краснухи в 1963–1964 гг. было зарегистрировано 10 000 выкидышей и мертворожденных, а также более 20 000 детей с синдромом врожденной краснухи (СВК) [15, 33, 42].

В настоящее время для профилактики краснухи и, прежде всего, СВК применяют живые ослабленные вакцины [3, 15, 10]. Первые вакцинные штаммы вируса краснухи — HPV77, HPV77.DE5 и HPV77.DK12 были получены американскими исследователями P.D. Parkman и соавт. в 1966 г. Однако созданные на основе данных штаммов вакцины были недостаточно эффективны и вызывали много побочных реакций. Аналогичные работы велись и другими исследовательскими группами. Так, Plotkin S.A. и соавт. выделили штамм RA27/3 из тканевого эксплантата плода при медицинском аборте. Штамм был аттенуирован на диплоидной линии клеток фибробластов эмбриона человека (Wistar 38) [9, 23]. Клинические и полевые испытания позво-

лили установить достаточную иммуногенность и низкую реактогенность данного штамма. Так, во время эпидемии на Тайване среди привитых была установлена высокая иммуногенная активность штамма (97%) [23]. В 1971 г. в Европе, была впервые зарегистрирована вакцина на основе штамма Wistar RA27/3 [39, 65, 71]. В настоящее время во всем мире, за исключением Китая и Японии, специфическая профилактика краснухи проводится вакцинами на основе штамма Wistar RA27/3.

Японскими исследователями были выделены и аттенуированы на первичной культуре клеток почки кролика пять эндемичных для территории Японии штаммов вируса краснухи — Matsuba, Takahashi, KRT, MEQ-11 и TO-336. В Китае вакцинопрофилактику краснухи проводят живыми вирусными вакцинами на основе вакцинного штамма DCRB 19 [5, 9].

В СССР также велись исследования по получению вакцинных штаммов вируса краснухи. В 1979 г. в НИИЭМ им. Пастера В.Н. Мешаловой был выделен штамм «Орлов» из смыва зева ребенка, больного манифестной формой инфекции. Штамм был аттенуирован серийным пассированием в первично-трипсинизированной культуре клеток почки кролика (ППК) [26]. Однако, несмотря на успешно проведенные клинические испытания, показавшие высокую иммуногенность и низкую реактогенность данного штамма, вакцинный штамм «Орлов» не был внедрен в производство [33].

Исследования в этом направлении были возобновлены в начале 2000-х гг. Штамм «Орлов-В» был восстановлен после длительного хранения, адаптирован к более технологичному тканевому субстрату (диплоидная линия клеток человека); были проведены доклинические испытания штамма на обезьянах макаках-резус, подтвердившие специфическую безопасность и выраженную специфическую активность штамма (по показателям иммуногенности и протективности). В молекулярно-генетических исследованиях была показана целесообразность его применения на территории РФ [19, 20, 21].

Специфическая профилактика краснухи проводится в РФ с 1997 г. Ввиду того что в России до сих пор нет своего отечественного препарата против краснухи, все эти годы население иммунизируют живой краснушной вакциной на основе вакцинного штамма Wistar RA27/3 [15, 31, 37].

Учитывая чрезвычайную актуальность профилактики вирусных инфекций детского возраста для здравоохранения, с 2001 г. на территории РФ вакцинацию детей против кори, краснухи и ЭП осуществляют как моновакцинами (ЖПВ, ЖКВ), дивакцинами (ассоциированной паротитно-коревой вакциной [АПКВ]), так и тривакцинами. По данным литературных источников использование комбинированных вакцин экономически выгодно, так как приво-

дит к уменьшению числа прививок, сокращению количества визитов к врачу, снижению напряженности Национального календаря профилактических прививок и уменьшению расходов на вакцинацию [13, 30, 41].

На территории России, кроме отечественной АПКВ, лицензированы и применяются другие комбинированные вакцины (корь, краснуха, паротит) производства зарубежных фирм. Так, первой ассоциированной вакциной в России была зарегистрирована вакцина MMR II фирмы «Merck Sharp & Dohme» (США), содержащая в одной прививочной дозе не менее 1000 ТЦД₅₀ вакцинного штамма вируса кори Enders, вируса краснухи Wistar RA 27/3 не менее 1000 ТЦД₅₀ и вируса паротита Jeryl Lynn не менее 5000 ТЦД₅₀. В 2000 г. в РФ была зарегистрирована тривакцина «Приорикс» фирмы «GlaxoSmithKline Biologicals s.a.» (Бельгия), содержащая в одной прививочной дозе вакцинного штамма вируса кори Schwarz не менее 3500 ТЦД₅₀, вируса краснухи Wistar RA 27/3 не менее 3500 ТЦД₅₀ и вируса паротита RIT4385, производного Jeryl Lynn, не менее 4300 ТЦД₅₀ [9]. Таким образом, современная тактика вакцинопрофилактики, при которой используют различные ассоциированные вакцины, увеличивает число контролируемых с помощью иммунизации инфекций. Однако необходимо отметить, что вакцинные штаммы тривакцины «Приорикс», также как и вакцинные штаммы MMR II, культивируются отдельно: вакцинные штаммы вируса краснухи — на диплоидных клетках человека, а вакцинные штаммы вирусов кори и ЭП — на культуре клеток куриного эмбриона. По данным ранее проведенных исследований, использование в качестве субстрата клеток куриных эмбрионов не исключает риск возникновения анафилактических реакций гиперчувствительности немедленного типа на куриный белок [43].

Проведение массовой вакцинации привело к глобальной ликвидации оспы, прекращению циркуляции диких полиовирусов в Американском, Европейском и Западно-Тихоокеанском географических регионах ВОЗ [65, 66], а также позволило резко снизить заболеваемость другими управляемыми инфекциями в мире. Однако, несмотря на существенное снижение заболеваемости контролируемых с помощью иммунизации инфекций, вакцинация живыми аттенуированными вакцинами может вызвать незначительные и, реже, серьезные побочные эффекты.

Имеется ряд публикаций, свидетельствующих о развитии специфических реакций у привитых вакцинными штаммами вирусов кори, паротита, полиомиелита и краснухи, используемых для изготовления живых вирусных вакцин [59]. К доказанным осложнениям паротитной вакцинации относят асептический менингит, к краснушной — острый артрит, к полиомиелитной — вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП) [55, 58, 69].

Так, в США с 1961 по 1998 гг. вакцинопрофилактику полиомиелита проводили исключительно трехвалентной ОПВ. Несмотря на положительную тенденцию в снижении заболеваемости полиомиелитом в стране ежегодно регистрировали от 1 до 25 случаев ВАПП, развивающихся после иммунизации живой ОПВ [17, 82]. В странах Европы также были зарегистрированы случаи ВАПП у детей привитых ОПВ на основе аттенуированных вакцинных штаммов Себина [70]. Как показали исследования, ВАПП может развиваться у иммунокомпетентных детей не только после иммунизации живой ОПВ, но и после контакта непривитых детей с лицами, привитыми этой вакциной [46, 79]. В связи с чем в последние годы в большинстве индустриально развитых стран были приняты документы, запрещающие проведение вакцинации детей в возрасте до 1 года ОПВ [67]. По данным Platt L.R. и соавт. в тех странах, где вакцинопрофилактику все же проводят ОПВ, риск развития ВАПП может варьировать от 2,9 до 4,7 случаев на миллион вакцинированных детей [72]. Весьма иллюстративными оказались эпидемиологические наблюдения за ВАПП, проведенные в Индии и Нигерии. В этих странах вакцинопрофилактика полиомиелита проводится ОПВ. Так, в Нигерии в 2009 г. было зарегистрировано 153 случая ВАПП, а на территории Индии в период с 2009 по 2011 гг. — 437 случаев [67, 79]. В нашей стране в период с 1998 по 2010 гг. было зарегистрировано 114 случаев ВАПП. Из них 81 случай у реципиентов ОПВ и 33 случая у контактных лиц. В связи с чем в 2009 г. были включены изменения в Национальный календарь профилактических прививок — иммунопрофилактика детей до 1 года проводится с использованием двух первых доз ИПВ и третьей дозы ОПВ [7, 16, 40].

В отчете специальной комиссии Института медицины США достоверно показана связь между развитием острого артрита и вакцинацией против краснухи живой аттенуированной вакциной на основе вакцинного штамма RA27/3 [58].

В литературе описаны случаи развития асептического менингита, возбудителями которого являются вакцинные штаммы Urabe Am9 и Leningrad-Zagreb вируса паротита [49, 55]. В 1989 г. по всей Японии была отмечена вспышка неврологических осложнений после проведения массовой иммунизации населения комбинированной вакциной против кори, краснухи и эпидемического паротита (MMR). У 311 из 630 157 иммунизированных трехвалентной вакциной, содержащей вакцинный штамм Urabe Am9 вируса эпидемического паротита, было зарегистрировано развитие асептического менингита, из них 96 случаев имели клинико-лабораторное подтверждение, вакцинный штамм вируса паротита был выделен из спинномозговой жидкости больных [77]. По данным Fujinaga T. и соавт. в это же время в префектуре Гунма (Япония) было зарегистрировано 35 случаев асептического менин-

гита, развитие которого наблюдалось на третьей неделе после иммунизации MMR вакциной. Вакцинный штамм Urabe Am9 вируса паротита был изолирован из спинномозговой жидкости у 13 пациентов. Также в течение двух месяцев после иммунизации у 6 детей были зарегистрированы судорожные расстройства и у 2 — паротит [57].

В начале 90-х гг. XX в. во Франции вакцинация против эпидемического паротита также проводилась вакцинами на основе вакцинного штамма Urabe Am9. С 1991 по 1993 гг. на территории Франции было зарегистрировано 116 случаев заболеваний асептическим менингитом, ассоциированных с вакцинным штаммом. Французские исследователи оценили риск развития асептического менингита как 1 случай на 28 400 доз вакцин, содержащих вакцинный штамм Urabe Am9 [73].

Miller E. и соавт. наблюдали в том же году в Великобритании 28 больных асептическим менингитом, возбудителем которого являлся вакцинный штамм Urabe. Риск развития асептического менингита после проведенной кампании иммунизации был оценен как 1 случай на 11 000 доз, однако он был в 4 раза ниже, чем риск развития асептического менингита от дикого вируса паротита. Ими же было отмечено отсутствие неврологических осложнений у привитых вакциной MMR, содержащей живую паротитную вакцину на основе штамма Jeryl Lynn [63].

В 1997 г. в Бразилии, в городе Сальвадор, была проведена массовая иммунизация детей в возрасте от 1 года до 11 лет комбинированной вакциной MMR, содержащей в качестве паротитного компонента вакцинный штамм Urabe, после чего наблюдалась вспышка асептического менингита: было зарегистрировано 87 случаев развития асептического менингита, у 58 детей из спинномозговой жидкости был выделен вакцинный штамм Urabe. Пик развития асептического менингита у привитых наблюдался на третьей неделе после получения вакцины, что полностью совпадает с данными других авторов [54, 55]. В результате проведения массовой вакцинации детей в Сальвадоре, риск развития асептического менингита был оценен как 1 случай на 14 000 вакцинированных детей [56]. В том же году в пяти муниципалитетах штата Риу-Гранди-ду-Сул бразильские врачи также зарегистрировали вспышку асептического менингита вскоре после проведения вакцинации 105 098 детей вакциной MMR, производства «Serum Institute», Индия. Комбинированный препарат содержал лиофилизированную живую коревую вакцину из штамма Edmonston-Zagreb, живую паротитную вакцину из штамма Leningrad-Zagreb, культивируемого на культуре клеток куриного эмбриона, и живую краснушную вакцину из штамма Wistar RA 27/3. По оценкам экспертов общий риск развития неврологических осложнений после проведения иммунизации вырос в 12,2 раза по срав-

нению с аналогичным периодом в 1995–1996 гг. Da Silvera С.М. и соавт., проводившие оценку риска развития асептического менингита, ассоциированного с вакцинным штаммом Leningrad-Zagreb вируса эпидемического паротита, оценили риск как 2,9 случаев на 10 000 доз, эквивалентный 1 случаю на 3390 доз [53].

В середине 90-х гг. XX в. японскими исследователями было проведено сравнение четырех комбинированных MMR вакцин: трех отечественного производства («Takeda», «Kitasato» и «Biken») и одной стандартной. Все японские вакцины были приготовлены из аттенуированных вакцинных штаммов вируса кори (АК-С), эпидемического паротита (Urabe Am9) и краснухи (То336). Стандартная MMR вакцина также содержала паротитную вакцину из штамма Urabe Am9. По результатам 35-дневного наблюдения за 38 203 иммунизированными одной из четырех вакцин были отмечены специфические реакции: судороги, лихорадка, сопровождающаяся рвотой, увеличение заушных лимфатических узлов

и асептический менингит. Установлено, что риск развития асептического менингита составил 16,6; 11,6; 3,2 и 0 случаев на 10 000 привитых для стандартной, «Takeda», «Kitasato» и «Biken» MMR вакцин соответственно. Национальный институт здоровья (Япония) обнаружил различия в биологических характеристиках вакцинного штамма Urabe Am9 вируса эпидемического паротита, содержащегося в стандартной MMR вакцине и в MMR вакцине производства «Biken» [61].

Однако длительный опыт вакцинопрофилактики как у нас в стране, так и за рубежом, убедительно показывает, что риск развития поствакцинальных осложнений в постпрививочном периоде несоизмеримо ниже, чем от соответствующих инфекций [6, 24].

Несмотря на внедрение в практику новых вакцин третьего и четвертого поколений, живые аттенуированные вакцины не утрачивают своей значимости и используются в вакцинопрофилактике управляемых инфекций как наиболее эффективные иммунобиологические препараты.

Список литературы/References

1. Агафонов А.П., Игнатъев Г.М., Пьянков С.А., Лосев М.В. Корь. 2005. 38 с. [Agafonov A.P., Ignatyev G.M., Piankov S.A., Losev M.V. Kor' [Measles]. 2005. 38 p.]
2. Анджапаридзе О.Г., Черновский Г.И. Краснуха. М.: Медицина, 1975. 102 с. [Andzhaparidze O.G., Chernovsky G.I. Krasnukha [Rubella]. Moscow: Meditsina, 1975. 102 p.]
3. Бекзентеев Р.Р. Прививка, которая остановит трагедию врожденной краснухи // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 1999. № 1. С. 10–12. [Bekzenteev R.R. Vaccination, which will stop the congenital rubella tragedy. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 1999, no. 1, pp. 10–12. (In Russ.)]
4. Бектимиров Т.А. Вакцинопрофилактика кори на современном этапе // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2001. № 1. С. 13–15. [Bektimirov T.A. Measles vaccine prophylaxis now. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 2001, no. 1, pp. 13–15. (In Russ.)]
5. Бектимиров Т.А. Мировой опыт иммунопрофилактики краснухи // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2004. № 6. С. 3–5. [Bektimirov T.A. World experience of rubella immune prophylaxis. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 2004, no. 6, pp. 3–5. (In Russ.)]
6. Бектимиров Т.А. Побочные действия вакцин // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2000. № 2. С. 6–7. [Bektimirov T.A. Side effects of vaccines. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 2000, no. 2, pp. 6–7. (In Russ.)]
7. Бичурина М.А., Лялина Л.В., Железнова Н.В., Канаева О.И., Антипова А.Ю., Тимофеева Е.В. Результаты сертификации территорий Северо-Западного федерального округа на отсутствие эндемичной кори: аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2012. 60 с. [Bichurina M.A., Lyalina L.V., Zheleznova N.V., Kanaeva O.I., Antipova A.Yu., Timofeeva E.V. Rezul'taty sertifikatsii territorii Severo-Zapadnogo federal'nogo okruga na otsutstvie endemichnoi kori: analiticheskii obzor [The results of the North-West Federal District areas certification for the absence of endemic measles: analytical review]. *SPb.: SPb Pasteur Institute*, 2012. 60 p.]
8. Бойчук Л.М., Шикина Е.С., Смородинцев А.А. Иммунопрофилактика вирусных инфекций // Труды Института имени Пастера; т. 62. Л., 1986. С. 26–34. [Boychuk L.M., Shikin E.S., Smorodintsev A.A. Immunoprofilaktika virusnykh infektsii [Immune prophylaxis of viral infections]. *Proceedings of the Pasteur Institute*; vol. 62. Leningrad, 1986, pp. 26–34.]
9. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хайтова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 880 с. [Vaktsiny i vaktsinatsiya: natsional'noe rukovodstvo. Pod red. V.V. Zvereva, B.F. Semenova, R.M. Khaitov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 880 p.]
10. Вашилин Г.В., Гагаловская Л.А., Гнатив М.М., Тандура Н.Г., Загорюлько Т.Д., Зайцева Л.М., Мартынюк Ж.И. К вопросу о врожденной краснухе — случай из практики // Современная педиатрия. 2011. № 3. С. 41–43. [Vaschilin G.V., Gagalovskaya L.A., Gnativ M.M., Tandoora N.G., Zagorulko T.D., Zaytseva L.M., Martynyuk Zh.I. On the question of congenital rubella — case study. *Sovremennaya pediatriya = Modern Pediatrics*, 2011, no. 3, pp. 41–43. (In Russ.)]
11. Дроздов С.Г. М.П. Чумаков и ликвидация полиомиелита на земном шаре // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2002. № 6. С. 8–9. [Drozdov S.G. M.P. Chumakov and polio eradication around the Globe. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 2002, no. 6, pp. 8–9. (In Russ.)]
12. Зверев В.В. Средства профилактики краснухи и их экономический эффект // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 1999. № 1. С. 9–11. [Zverev V.V. Means of rubella prophylaxis and their economic effect. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 1999, no. 1, pp. 9–11. (In Russ.)]
13. Зверев В.В. Эпидемический паротит // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2003. № 1. С. 2–3. [Zverev V.V. Parotitis. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, no. 1, pp. 2–3. (In Russ.)]

14. Зверев В.В., Десяткова Р.Г. Врожденная краснуха // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2004. № 6. С. 7–8. [Zverev V.V., Desyatskova R.G. Congenital rubella. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news, 2004, no. 6, pp. 7–8. (In Russ.)*]
15. Зверев В.В., Юминова Н.В. Проблемы кори, краснухи и эпидемического паротита в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2004. № 3. С. 8–11. [Zverev V.V., Yuminova N.V. Problems of measles, parotitis and rubella in the Russian Federation. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2004, no. 3, pp. 8–11. (In Russ.)*]
16. Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Ляшинская Е.В., Короткова Е.А., Яковенко М.Л., Чернявская О.П., Черкасова Е.А., Драгунская Е.М., Деконенко Е.П., Мартыненко И.Н., Краснопрошина Л.И., Сорокина М.П. Паралитический полиомиелит в Российской Федерации в 1998–2000 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2007. № 5. С. 37–44. [Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Lyaschinskaya E.V., Korotkova E.A., Yakovenko M.L., Chernyavskaya O.P., Cherkasova E.A., Dragunskaya E.M., Dekonenko E.P., Martynenko I.N., Krasnoproshina L.I., Sorokina M.P. Paralytic poliomyelitis in the Russian Federation in the period of 1998–2000. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2007, no. 5, pp. 37–44. (In Russ.)*]
17. Иванова О.Е. Полиомиелит и стратегия вакцинации в Российской Федерации в постсертификационный период // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 3. С. 110–114. [Ivanova O.E. Polio and vaccination strategy in the Russian Federation in postcertification period. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2011, no. 3, pp. 110–114. (In Russ.)*]
18. Кузьменко Л.Г., Овсянников Д.Ю., Киселева Н.М. Детские инфекционные болезни: учеб. для студ. высш. учеб. заведений. М.: Издательский центр «Академия», 2009. 528 с. [Kuzmenko L.G., Ovsyannikov D.Yu., Kiseleva N.M. *Detskie infektsionnye bolezni: ucheb. dlya stud. vyssh. ucheb. zavedenii [Children's infectious diseases: Textbook for the higher education institute students]. M.: Publishing Center "Academy", 2009. 528 p.]*
19. Лаврентьева И.Н., Жебрун А.Б. Разработка отечественной живой аттенуированной вакцины против краснухи на основе штамма «Орлов» (экспериментальные исследования) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 3. С. 72–75. [Lavrent'eva I.N., Zhebrun A.B. The development of the domestic live attenuated rubella vaccine based on a strain "Orlov" (experimental study). *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2010, no. 3, pp. 72–75. (In Russ.)*]
20. Лаврентьева И.Н., Семериков В.В., Агрба В.З., Сухобаевская Л.П., Антипова А.Ю. Поствакцинальный иммунитет при иммунизации против краснухи штаммом «Орлов-Д» в эксперименте // Пермский медицинский журнал. 2008. № 4. С. 68–75. [Lavrent'eva I.N., Semerikov V.V., Agrba V.Z., Sukhobaevskaya L.P., Antipova A.Yu. Post-vaccination immunity in immunization against rubella strain Orlov-D in the experiment. *Permskii meditsinskii zhurnal = Perm Medical Journal, 2008, no. 4, pp. 68–75. (In Russ.)*]
21. Лаврентьева И.Н., Семериков В.В., Жебрун А.Б., Фельдблюм И.В., Марков А.В. Краснуха в России: изменчивость возбудителя в период вакцинопрофилактики инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2008. № 3. С. 26–31. [Lavrent'eva I.N., Semerikov V.V., Zhebrun A.B., Feldblyum I.V., Markov A.V. Rubella in Russia: the pathogen variability during infection vaccine prophylaxis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2008, no. 3, pp. 26–31. (In Russ.)*]
22. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шевцова З.В., Стасилевич З.Н. Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах. Сочи: Стерх, 2011. 225 с. [Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Shevtsova Z.V., Stasilevich Z.N. *Modelirovanie infektsionnykh zabolevanii cheloveka na laboratornykh primatakh [Modeling of human infectious diseases in laboratory primates]. Sochi: Sterkh, 2011. 225 p.]*
23. Логинов А.В. Вакцина против краснухи, опыт применения в мире // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 1999. № 1. С. 12–14. [Loginov A.V. The vaccine against rubella: application experience in the world. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news, 1999, no. 1, pp. 12–14. (In Russ.)*]
24. Медуницын Н.В. Государственная система оценки безопасности вакцин // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2000. № 8. С. 4–6. [Medunitsyn N.V. State system for vaccine safety assessment. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news, 2000, no. 8, pp. 4–6. (In Russ.)*]
25. Медуницын Н.В. Вакцины для профилактики эпидемического паротита в России // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2003. № 1. С. 6–9. [Medunitsin N.V. Vaccines for the parotitis prophylaxis in Russia. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news, 2003, no. 1, pp. 6–9. (In Russ.)*]
26. Мешалова В.Н., Жукова Е.А., Степанов А.Н., Брусина Е.А. Прививочные свойства краснушной вакцины из штамма «Орлов» // Труды Института имени Пастера: Детские вирусные инфекции; т. 53. Л., 1979. С. 112–115. [Meshalova V.N., Zhukova E.A., Stepanov A.N., Brusina E.A. Privivochnye svoystva krasnuшной vaktsiny iz shtamma «Orlov» [Inoculation properties of rubella vaccine strain "Orlov"]. *Proceedings of Pasteur Institute: Children viral infections; vol. 53. Leningrad, 1979, pp. 112–115.]*
27. Михеева И.В., Лыткина И.Н. Эпидемиология и вакцинопрофилактика эпидемического паротита // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2003. № 1. С. 9–11. [Mikheeva I.V., Lytkina I.N. Epidemiology and vaccine prophylaxis of parotitis. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news, 2003, no. 1, pp. 9–11. (In Russ.)*]
28. Покровский В.Н., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 816 с. [Pokrovsky V.N., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. *Infektsionnye bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 816 p.]*
29. Попов В.Ф. Корь и коревая вакцина Л-16. М.: Триада-Х, 2002. 192 с. [Popov V.F. *Kor' i korevaya vaktsina L-16 [Measles and L-16 measles vaccine]. Moscow: Triada-X, 2002. 192 p.]*
30. Попов В.Ф. Оценка отечественной паротитно-коревой дивакцины // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2003. № 1. С. 11–13. [Popov V.F. Evaluation of domestic parotitis-measles bivalent vaccine. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news, 2003, no. 1, pp. 11–13. (In Russ.)*]
31. Присяжнюк Е.Н., Алекминская И.М., Приходченко Т.О., Каравянская Т.Н., Дудкина И.А., Исаева Н.В., Лебедева Л.А., Резник В.И. Особенности эпидемиологической ситуации по краснухе в Хабаровском крае в допрививочном периоде и в периоды проведения вакцинации // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2015. № 28. С. 44–48. [Prisyazhnyuk E.N., Alekminskaya I.M., Prikhodchenko T.O., Karavyanskaya T.N., Dudkina I.A., Isaeva N.V., Lebedeva L.A., Reznik V.I. Features of epidemiological situation of measles in Khabarovsk Region during prevaccination and vaccination periods. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoi patologii = Far Eastern Infectious Disease Journal, 2015, no. 28, pp. 44–48. (In Russ.)*]

32. Семененко Т.А., Русакова Е.В., Щербаков А.Г., Гайдаренко А.Д., Готвянская Т.П., Евсеева Н.Б., Гусева Е.В., Никитина Г.Ю., Шапошников А.А. Состояние популяционного иммунитета в отношении управляемых инфекций (по материалам банка сывороток крови) // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012. № 6. С. 10–15. [Semenenko T.A., Rusakova E.V., Shcherbakov A.G., Gaidarenko A.D., Gotvyanskaya T.P., Evseeva N.B., Guseva E.V., Nikitina G.Y., Shaposhnikov A.A. Status of population immunity against controlled infections (based on the serum bank materials). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2012, no. 6, pp. 10–15. (In Russ.)]
33. Семериков В.В., Лаврентьева И.Н., Таточенко В.К., Нисевич Л.Л., Фельдблюм И.В. Краснуха. Пермь — Санкт-Петербург — Москва: ИПК «Звезда», 2002. 175 с. [Semerikov V.V., Lavrent'eva I.N., Tatochenko V.K., Nisevich L.L., Feldblyum I.V. Krasnukha [Rubella]. *Perm — St. Petersburg — Moscow: IPK "Zvezda", 2002. 175 p.*]
34. Сергиев В.П. Ликвидация полиомиелита в Европейском регионе ВОЗ // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2002. № 6. С. 2–4. [Sergiev V.P. Polio eradication in the WHO Europe region. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 2002, no. 6, pp. 2–4. (In Russ.)]
35. Совершенствование эпидемиологического и вирусологического надзора за полиомиелитом в постсертификационный период ликвидации инфекции: аналитический обзор. Под ред. А.Б. Жербуна. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2013. 88 с. [Sovershenstvovanie epidemicheskogo i virusologicheskogo nadzora za poliomielitom v postsertifikatsionnyi period likvidatsii infektsii: analiticheskii obzor [Improving polio epidemiological and virological surveillance during post certification period of infection eradication: analytical review]. Ed. A.B. Zherbun. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2013. 88 p.]
36. Тарос Л.Ю., Смородинцев А.А. Реактогенные и иммуногенные свойства живой вакцины Ленинград-16 // Проблемы ликвидации кори. Л., 1968. С. 49–67 [Taros L.Yu., Smorodintsev A.A. Reaktogennye i immunogennye svoystva zhivoi vaktsiny Leningrad-16 // Problemi likvidatsii kori [Reactogenic and immunogenic properties of the Leningrad-16 live vaccine. In: Measles elimination problem. *Leningrad*, 1968, pp. 49–67.]
37. Таточенко В.К. Политика ВОЗ в отношении вакцинации против краснухи // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 1999. № 1. С. 8–10. [Tatochenko V.K. WHO policy on vaccination against rubella. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 1999, no.1, pp.8–10. (In Russ.)]
38. Титова Н.С. Эпидемический паротит и его профилактика // Сестринское дело. 1999. № 2. С. 36–38. [Titova N.S. Parotitis and its prevention. *Sestrinskoe delo = Nursing*, 1999, no. 2, pp. 36–38. (In Russ.)]
39. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Шамшева О.В. Инфекционные болезни у детей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 688 с. [Uchaikin V.F., Nisevich N.I., Shamsheva O.V. Infektsionnye bolezni u detei [Infectious diseases in children]. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2011. 688 p.]
40. Фельдблюм И.В. Вакцинопрофилактика как жизнеспасающая технология и инструмент демографической политики // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2011. № 2. С. 27–30. [Feldblyum I.V. Prophylactic vaccination as a life-saving technology and a tool of demographic policy. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2011, no. 2, pp. 27–30. (In Russ.)]
41. Фельдблюм И.В. Вакцинопрофилактика: теория и практика // Медицина в Кузбассе. 2013. № 2. С. 21–25. [Feldblyum I.V. Vaccines prophylaxis: theory and practice. *Meditsina v Kuzbasse = Medicine in Kuzbass*, 2013, no. 2, pp. 21–25. (In Russ.)]
42. Юминова Н.В. Диагностика краснухи в Российской Федерации // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2004. № 6. С. 5–7. [Yuminova N.V. Rubella diagnosis in the Russian Federation. *Vaktsinatsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccination news*, 2004, no. 6, pp. 5–7. (In Russ.)]
43. Юминова Н.В., Зверев В.В. Элиминация кори в России // Медицинская картотека. 2003. № 7. С. 24–25. [Yuminova N.V. Zverev V.V. Measles elimination in Russia. *Meditsinskaya kartoteka = Medical catalogue*, 2003, no. 7, pp. 24–25. (In Russ.)]
44. Acosta C.J., Galindo C.M., Deen J., Ochiai R., Lee H.J., Von Seidlein L., Carbis R., Clemens J.D. Vaccines against cholera, typhoid fever and shigellosis for developing countries. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2004, vol. 4, no. 12, pp. 1939–1951. doi: 10.1517/14712598.4.12.1939
45. Allerdist H., Ehrengut W. Measles and its complications in Hamburg from 1960 to 1973. *Immun. Infekt.*, 1976, vol. 4, no. 3, pp. 116–125.
46. Baicus A. History of polio vaccination. *World J. Virol.*, 2012, vol. 1, no. 4, pp. 108–114.
47. Barrabeig I., Torner N., Martínez A., Carmona G., Ciruela P., Batalla J., Costa J., Hernández S., Salleras L., Domínguez A. Results of the rubella elimination program in Catalonia (Spain), 2002–2011. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, vol. 9, no. 3, pp. 642–648. doi: 10.4161/hv.23260
48. Bechini A., Levi M., Boccalini S., Tiscione E., Panatto D., Amicizia D., Bonanni P. Progress in the elimination of measles and congenital rubella in Central Italy. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, vol. 9, no. 3, pp. 649–656. doi: 10.4161/hv.23261
49. Black S., Shinefield H., Ray P., Lewis E., Chen R., Glasser J., Hadler S., Hardy J., Rhodes P., Swint E., Davis R., Thompson R., Mullooly J., Marcy M., Vadheim C., Ward J., Rastogi S., Wise R. Risk of hospitalization because of aseptic meningitis after measles-mumps-rubella vaccination in one- to two-year-old children: an analysis of the Vaccine Safety Datalink (VSD) Project. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1997, vol. 16, no. 5, pp. 500–503.
50. Brown F. New approaches in viral vaccine development. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 1990, vol. 76, pp. 39–46.
51. Carter J.J., Madeleine M.M., Wipf G.C., Garcea R.L., Pipkin P.A., Minor P.D., Galloway D.A. Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, vol. 95, no. 20, pp. 1522–1530.
52. Chan C.-W. To screen or to vaccinate? A decision analysis for rubella prevention on campus. *J. Am. Coll. Health*, 1986, vol. 35, no. 3, pp. 116–121.
53. Da Silveira C.M., Kmetzsch C.I., Mohrdieck R., Sperb A.F., Prevots D.R. The risk of aseptic meningitis associated with the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain following mass vaccination with measles-mumps-rubella vaccine, Rio Grande do Sul, Brazil, 1997. *Int. J. Epidemiol.*, 2002, vol. 31, no. 5, pp. 978–982.
54. Demicheli V., Jefferson T., Rivetti A., Price D. Vaccines for measles, mumps and rubella in children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2005, Oct. 19(4).
55. Demicheli V., Rivetti A., Debalini M.G., Pietrantoni C.D. Vaccines for measles, mumps and rubella in children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, Feb. 15.

56. Dourado I., Cunha S., Teixeira M.G., Farrington C.P., Melo A., Lucena R., Barreto M.L. Outbreak of aseptic meningitis associated with mass vaccination with a urabe-containing measles-mumps-rubella vaccine: implications for immunization programs. *Am. J. Epidemiol.*, 2000, vol. 151, no. 5, pp. 524–530.
57. Fujinaga T., Motegi Y., Tamura H., Kuroume T. A prefecture-wide survey of mumps meningitis associated with measles, mumps and rubella vaccine. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1991, vol. 10, no. 3, pp. 204–209.
58. Howson C.P., Fineberg H.V. Adverse events following pertussis and rubella vaccines. Summary of a report of the Institute of Medicine. *JAMA*, 1992, vol. 267, no. 3, pp. 392–396.
59. Jefferson T., Price D., Demicheli V., Bianco E. Unintended events following immunization with MMR: a systematic review. *Vaccine*, 2003, vol. 21, no. 25–26, pp. 3954–3960.
60. Kenneth J.B., Stenhouse D.H. Measles and rubella on college campuses: the need to act. *J. Am. Coll. Health*, 1983, vol. 32, no. 2, pp. 58–62.
61. Kimura M., Kuno-Sakai H., Yamazaki S., Yamada A., Hishiyama M., Kamiya H., Ueda K., Murase T., Hirayama M., Oya A., Nozaki S., Murata R. Adverse events associated with MMR vaccines in Japan. *Acta Paediatr. Jpn.*, 1996, vol. 38, no. 3, pp. 205–211.
62. L'Huillier A.G., Posfay B.K. Live viral vaccines in transplanted patients. *Swiss Med. Wkly*, 2014, vol. 144:w14005.
63. Miller E., Goldacre M., Pugh S., Colville A., Farrington P., Flower A., Nash J., MacFarlane L., Tettmar R. Risk of aseptic meningitis after measles, mumps, and rubella vaccine in UK children. *Lancet*, 1993, vol. 341, no. 8851, pp. 979–982.
64. Measles — United States, January–May 20, 2011. *Morbidity and mortality Weekly Report, CDC*, May 24, 2011, vol. 60, pp. 1–4.
65. Minor P.D. Live attenuated vaccines: historical successes and current challenges. *Virology*, 2015, vol. 479–480, pp. 379–392. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.032
66. Mosquera M.A., Baron C. N., Ballester A.R. The road to polio eradication via the Pan American Health Organization. *Rev. Panam. Salud. Publica.*, 2014, vol. 36, no. 3, pp. 185–192.
67. Nokleby H., De Carvalho G.H., Johansen K., Kreidl P. Protection against poliomyelitis in Europe. *Euro Surveill.*, 2010, vol. 15, no. 17.
68. Norrby E., Prusiner S.B. Polio and nobel prizes: looking back 50 years. *Ann. Neurol.*, 2007, vol. 61, no. 5, pp. 385–395. doi: 10.1002/ana.21153
69. Orenstein W.A. Eradicating polio: how the world's pediatricians can help stop this crippling illness forever. *Pediatrics*, 2015, vol. 135, no. 1, pp. 196–202. doi: 10.1542/peds.2014-3163
70. Pellegrinelli L., Primache V., Fiore L., Amato C., Fiore S., Bubba L., Pariani E., Amendola A., Barbi M., Binda S. Surveillance of acute flaccid paralysis (AFP) in Lombardy, Northern Italy, from 1997 to 2011 in the context of the national AFP surveillance system. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2015, vol. 11, no. 1, pp. 277–281. doi: 10.4161/hv.36164
71. Phalgune D.S., Yervadekar R.C., Sharma H.J., Dhare R.M., Parekh S.S., Chandak A.O., Safai A.A., Shewale S.D. Sero-surveillance to assess rubella susceptibility and assessment of immunogenicity and reactogenicity of rubella vaccine in Indian girls aged 18–24 years. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, vol. 10, no. 10, pp. 2813–2818. doi: 10.4161/21645515.2014.970947
72. Platt L.R., Estivariz C.F., Sutter R.W. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis: a review of the epidemiology and estimation of the global burden. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 210, pp. 380–389. doi: 10.1093/infdis/jiu184
73. Rebiere I., Galy-Eyraud C. Estimation of the risk of aseptic meningitis associated with mumps vaccination, France, 1991–1993. *Int. J. Epidemiol.*, 1995, vol. 24, no. 6, pp. 1223–1227.
74. Roca-Garcia M., Orsi E.V., Jervis G.A., Markham F.S., Bacigalupi J.C., Doany H., Tosi H., Cabasso V.J., Mover A.W., Cox H.R. Laboratory studies associated with field trials of monovalent oral poliovirus vaccines. *J. Infect. Dis.*, 1960, vol. 107, no. 3, pp. 300–317.
75. Sawada K. Immunologic efficacy of live polio vaccines and propagation of the vaccine viruses. Studies of the immunologic efficacy of the live polyvalent polio vaccines. *Nihon Shonika Gakkaizasshi.*, 1965, vol. 69, no. 4, pp. 309–318.
76. Shlyakhov E., Blancou J., Rubinstein E. Vaccines against anthrax in animals, from Louis Pasteur to our day. *Rev. Sci. Tech.*, 1996, vol. 15, no. 3, pp. 853–862.
77. Sugiura A., Yamada A. Aseptic meningitis as a complication of mumps vaccination. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1991, vol. 10, no. 3, pp. 209–213.
78. Trevelyan B., Smallman-Raynor M., Cliff A.D. The spatial dynamics of poliomyelitis in the United States: from epidemic emergence to vaccine-induced retreat, 1910–1971. *Ann. Assoc. Am. Geogr.*, 2005, vol. 95, no. 2, pp. 269–293.
79. Verma R., Khanna P., Chawla S. Inactivated polio vaccine: time to introduce it in India's national immunization schedule. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, vol. 8, no. 7, pp. 956–958. doi: 10.4161/hv.20089
80. Verma R., Khanna P., Chawla S. New horizon in prevention of congenital rubella syndrome in the India. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, vol. 8, no. 6, pp. 831–833. doi: 10.4161/hv.19584
81. Walkowska E. Investigations on adaptation of influenza virus B (Lee) in the mouse. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1950, vol. 2, no. 2, pp. 295–297.
82. Wattigney W.A., Mootrey G.T., Braun M.M., Chen R.T. Surveillance for poliovirus vaccine adverse events, 1991 to 1998: impact of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. *Pediatrics*, 2001, vol. 107, no. 5, pp. E83.
83. World Health Organization Regional Office for Europe. *WHO Epidemiological brief. Copenhagen*, 2012, no. 26, pp. 1–11.

Автор:

Шамсутдинова О.А., научный сотрудник лаборатории иммунологии и биологии клетки ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, г. Сочи, Россия.

Author:

Shamsutdinova O.A., Researcher, Laboratory of Immunology and Cell Biology, Institute of Medical Primatology, Sochi, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.06.2016
Отправлена на доработку 28.11.2016
Принята к печати 30.01.2017

Received 21.06.2016
Revision received 28.11.2016
Accepted 30.01.2017

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Flu-Chim, СОДЕРЖАЩЕГО ОСНОВНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСОВ ГРИППА А И В

И.В. Духовлинов¹, О.А. Добровольская², А.И. Орлов³

¹ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ООО «Универсальные биосистемы», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Вирус гриппа вызывает высококонтагиозное заболевание людей, птиц и млекопитающих. Подсчитано, что ежегодно от эпидемий гриппа погибает от 250 000 до 500 000 человек и эта цифра может увеличиваться до 1 млн в период возможных пандемий вируса гриппа. Самым эффективным путем профилактики болезни или ее тяжелых последствий является вакцинация. На данный момент существует несколько подходов для создания противогриппозных вакцин, но они имеют ряд недостатков, которые снижают общую эффективность вакцинных препаратов. Соответственно, создание универсальной вакцины, способной обеспечить надежную защиту от существующих и возможных реассортантных штаммов вируса гриппа, на данный момент является приоритетной задачей. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и инактивированного. Данная работа посвящена получению высокоочищенного гибридного рекомбинантного белка, включающего фрагменты белков гемагглютинаина вирусов гриппа А и В, а также компоненты флагеллина в качестве адьюванта. Указанные фрагменты белков представляют собой консервативные части гемагглютининов Н1, Н3, Н5 и В, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов вирусов гриппа А и В. Выбранные участки белков наиболее иммуногенны. Их присутствие обеспечивает как В-клеточный, так и Т-клеточный иммунный ответ. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Гибридный белок, содержащий В- и Т-клеточные эпитопы разных субтипов вирусов гриппа А и В, а также флагеллин, позволят обеспечить сильный иммунный ответ при меньших затратах на производство. Нами был смоделирован гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim, содержащий иммуногенные эпитопы вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н5N1 и В, слитые с фрагментами флагеллина. Был создан высокопродуктивный штамм-продуцент, на основе клеток *E. coli* BL21(DE3). Была изучена экспрессия гибридного гена *flu-chim* при различных условиях индукции. Также был получен высокоочищенный гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim с использованием металлоафинной хроматографии. Чистота белка после финальной стадии очистки составила 98%. В дальнейшем планируется изучение иммунологических свойств полученного рекомбинантного белка.

Ключевые слова: вирус гриппа, универсальная вакцина, рекомбинантный белок, гемагглютинин, иммуногенность, хроматография.

Адрес для переписки:

Добровольская Ольга Андреевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: dobrovolskay-oly@yandex.ru

Contacts:

Olga A. Dobrovolskaia
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Akademika Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: dobrovolskay-oly@yandex.ru

Библиографическое описание:

Духовлинов И.В., Добровольская О.А., Орлов А.И. Получение гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim, содержащего основные эпитопы вирусов гриппа А и В // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 117–122. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-117-122

Citation:

Dukhovlinov I.V., Dobrovolskaya O.A., Orlov A.I. Production of hybrid recombinant protein Flu-Chim, containing influenza viruses A and B major epitopes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 117–122. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-117-122

PRODUCTION OF HYBRID RECOMBINANT PROTEIN Flu-Chim, CONTAINING INFLUENZA VIRUSES A AND B MAJOR EPITOPES

Dukhovlinov I.V.^a, Dobrovolskaia O.A.^b, Orlov A.I.^c

^a LLC ATG Service-Gene, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c LLC Universal Biosystems, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The influenza virus is highly contagious diseases of people, birds and mammals. Approximately 250 000–500 000 deaths are caused by influenza epidemics worldwide yearly, and the death number may be up to millions in a possible influenza pandemic. Vaccination is the most cost-effective way to reduce the considerable disease burden of seasonal influenza. Although seasonal influenza vaccines are effective, their performance in the elderly and immunocompromised individuals would benefit from improvement. Major problems related to the development and production of pandemic influenza vaccines are response time and production capacity as well as vaccine efficacy and safety. Reverse genetics techniques can speed up the generation of seed viruses and new mathematical modelling methods improve vaccine strain selection. Using vaccines based on recombinant proteins, we avoid the risks associated with the introduction of the virus into the body, even inactivated. In this paper, we have got a highly purified recombinant fusion protein composed of fragments of the hemagglutinin of influenza viruses A and B. As adjuvant we used components of flagellin. We used the most immunogenic and conserved areas of hemagglutinin H1, H3, H5 and B, which cause the formation of specific antibodies which can cross-react with homologous epitopes among the various strains of influenza A and B. Vaccine efficacy is increased by using multiple epitopes of various proteins. The aim of this study was to clone and express the hybrid recombinant protein Flu-Chim, containing immunogenic epitopes of influenza A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1 and B fused with fragments of flagellin in *Escherichia coli* expression system and its subsequent purification. During the study was created high-yield *E. coli* strain, which produces the recombinant protein Flu-Chim, selected the optimal protocol of induction of the gene encoding the protein. The protein was purified using metal affinity chromatography. The purity of the final preparation reached 98%. In the future, we are going to study the immunogenic properties of the protein and use it as a component of the candidate vaccine against influenza.

Key words: influenza virus, universal vaccine, recombinant proteins, hemagglutinin, immunogenicity, chromatography.

Введение

Вирусы гриппа относятся к группе возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). В России на долю ОРВИ ежегодно приходится до 90% от всех регистрируемых инфекционных заболеваний. Эпидемии гриппа могут оказывать серьезное воздействие на все возрастные группы населения, но наибольший риск развития осложнений отмечен у детей до двух лет и у взрослых в возрасте 65 лет и старше, а также людям с хроническими заболеваниями или с ослабленной иммунной системой. По данным Минздрава РФ, ежегодные экономические потери, связанные с эпидемиями гриппа, составляют около 85% от всего ущерба, наносимого инфекционными болезнями [1, 5, 12].

Всемирной организацией здравоохранения в качестве основного средства борьбы против гриппа в настоящее время рекомендована вакцинация, которая наиболее эффективна в тех случаях, когда циркулирующие в популяции вирусные штаммы в значительной мере соответствуют штаммам, заложенным в состав вакцины. Однако существует опасность пандемического распространения отдельных штаммов вируса гриппа, комбинация генов которых ранее не встречалась в популяции. Наибольшее

эпидемическое значение имеют вирусы гриппа А и В. Непредсказуемость эпидемий обусловлена антигенной изменчивостью вирусов гриппа А, приводящей к частичному или полному изменению групповых и штаммовых детерминант — гемагглютиниона и нейраминидазы [9].

Важнейшей проблемой существующих в настоящее время вакцин против гриппа является их узкая специфичность и необходимость ежегодного обновления штаммового состава вакцины. Именно это является причиной пристального внимания мирового научного сообщества к разработке универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Такие универсальные вакцины призваны обеспечить защиту против любого серотипа вируса гриппа А, в результате чего отпадает необходимость в ежегодной вакцинации, и, как следствие этого, существенно снижаются затраты на производство профилактических противогриппозных вакцин. В связи с этим создание универсальной вакцины, которая защищала бы от широкого спектра вирусов гриппа А и, особенно, пандемически опасных штаммов, ранее не циркулировавших среди людей, является весьма актуальной задачей [3]. Использование вакцин на основе ре-

комбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и инактивированного.

На данный момент разработано несколько кандидатных универсальных вакцин против гриппа. Так, известна кандидатная вакцина, в которой в составе векторной конструкции используется ген, кодирующий мультиэпитопный гемагглютинин вируса гриппа птиц; данная конструкция оптимизирована для получения в клетках растений [4]. Также в ряде работ были использованы бакуловирусные конструкции для экспрессии гемагглютинина вирусов гриппа А или В в клетках насекомых [13]. Недостатками подобных подходов является использование последовательности белка (гемагглютинина) только одного субтипа вируса гриппа, что ограничивает спектр активностей вакцины. Также экспрессия в растениях и в клетках насекомых обеспечивает низкий выход белка, по сравнению с экспрессией в клетках *E. coli*.

Также известен ряд работ, в которых используют поливалентный противогриппозный антиген, адъювант и агент, обеспечивающий проникновение вакцины. В качестве антигенной компоненты заявлены любые из Н1-Н16 и N1-N9 [11]. Также известна поливалентная вакцина против гриппа, антигенной компонентой которой являются поверхностные белки вирусов А/Н1N1, А/Н3N2, гемагглютинин В-типа, в качестве адъюванта в этой работе использовали глицерол или гидроксид алюминия [7].

Данная работа посвящена получению высокоочищенного гибридного рекомбинантного белка, включающего фрагменты белков Н1, Н3, Н5 вируса гриппа А, а также фрагмент гемагглютинина вируса гриппа В, а также компоненты флагеллина в качестве адъюванта. Перечисленные фрагменты белков представляют собой консервативные части гемагглютининов Н1, Н3, Н5 и В, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов вирусов гриппа А и В. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Использование слитого белка, содержащего В- и Т-клеточные эпитопы разных субтипов вирусов гриппа А и В, а также флагеллин, позволит обеспечить сильный иммунный ответ при меньших затратах на производство. Целесообразно использование лишь компонентов флагеллина. На данный момент флагеллин является одним из наиболее перспективных и хо-

рошо изученных адъювантов нового поколения. Результаты исследований показывают, что рекомбинантные белки, вводимые с компонентами флагеллина, имеют повышенные иммуногенные и антигенные характеристики. Последние вызывают формирование более сильного клеточного и гуморального иммунного ответа, который регистрируется в более короткие сроки [2].

Использование антигенных детерминант в гибридной конструкции и только одного типа белка (гемагглютинина) позволяет упростить и удешевить процесс производства вакцины, поскольку отпадает необходимость дополнительного подбора условий и контроля качества производства компонентов.

Материалы и методы

Синтез и клонирование гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim

Перевели аминокислотную последовательность гибридного белка Flu-Chim, включающего фрагменты FliC1, FliC2, Н1, Н3, Н5, В, в нуклеотидную (1785 п.н.), кодонно оптимизировав последнюю для экспрессии в клетках *E. coli*. Синтез данной нуклеотидной последовательности осуществляли путем удлинения взаимоперекрывающихся олигонуклеотидов согласно описанным методам [8]. Олигонуклеотиды представляли собой фрагменты гибридного гена длиной около 70 нуклеотидов со взаимоперекрывающимися участками длиной около 20 нуклеотидов. В общей сложности для синтеза гибридного гена длиной 1785 п.н. было использовано 65 праймеров. Синтезированные фрагменты по 300 п.н. выделяли с помощью гель-электрофореза и клонировали в плазмидном векторе pGEM-T Easy. Клонирование осуществляли с использованием рестрикционных сайтов KpnI, SacII, EcoRV, BamHI или посредством «тупых» концов. После секвенирования фрагменты амплифицировали, после чего соединяли в нуклеотидную последовательность гибридного белка путем их сплавления методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). После заключительного этапа синтеза гибридного гена путем лигирования фрагментов данный искусственный ген, *flu-chim*, клонировали в векторе pGEM-T по рестрикционным сайтам KpnI и SacI. Далее ген *flu-chim* амплифицировали с использованием ПЦР и праймеров, в состав которых введены рестрикционные сайты EcoRI, для замены соответствующего сайта рестрикции на 5'-конце, и XhoI — на 3'-конце гена. Далее наработанный ПЦР-фрагмент и экспрессионный вектор pET28a(+) обрабатывали рестриктазами EcoRI и XhoI и лигировали. Осуществляли трансформацию клеток

Escherichia coli DH10B/R (Invitrogen, США) полученной лигазной смесью методом электропорации с дальнейшим высевом на селективную питательную среду. Осуществляли скрининг клонов. Выделенную плазмидную ДНК проверяли с помощью ПЦР и рестрикционного анализа с последующим проведением электрофореза в агарозном геле.

В ходе работы были отобраны клоны клеток *E. coli*, содержащие фрагменты ДНК требуемого размера в составе плазмиды, из которых такие плазмиды, pET28a(+)-flu-chim, были выделены для создания штамма *E. coli* для дальнейшей экспрессии гибридного гена.

Создание штамма-продуцента гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim

Для создания штамма-продуцента гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США). Трансформацию компетентных клеток плазмидой pET28a(+)-flu-chim осуществляли методом электропорации.

Для быстрого скрининга рекомбинантных клонов *E. coli* на наличие плазмид pET28a(+)-flu-chim плазмидную ДНК выделяли из 2 мл культуры и анализировали электрофорезом в агарозном геле. Для проверки наличия вставки целевого гена в плазидах проводили секвенирование.

Индукция экспрессии гена flu-chim

Осуществляли подбор оптимального протокола индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный белок Flu-Chim. Для этого проводили индукцию экспрессии гена двумя способами — с помощью изопропил-β-D-1-тиогактопиранозиды (ИПТГ) в трех концентрациях и 0,2% лактозы (по Штудиеру) [14].

Индукцию экспрессии гибридного гена 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 0,1; 0,5 или 1 мМ. Оставляли на 10 ч для определения оптимального уровня экспрессии гена, после чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Индукцию экспрессии гибридного гена 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 Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0,5% глицерол, 0,05% глюкозу и 0,2% лактозу, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После ферментирования при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение 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 [6].

Очистка гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim

Очистку гибридного рекомбинантного белка Flu-Chim проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [10]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка.

Клетки продуцента лизировали с помощью 5 циклов соникации по 30 с с перерывом в 2 мин на льду. Затем проводили разрушение телец включения путем инкубации в течение часа с лизирующим буфером, содержащим 500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 6 М гуанидина гидрохлорида, 500 мМ хлористого натрия.

Колонка, содержащая Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивалась буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористого натрия, 10 мМ имидазола). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения. После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористого натрия, 30 мМ имидазола). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористого натрия, 200 мМ имидазола). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли по методу Лоури.

Результаты

Нами был смоделирован гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim, содержащий иммуногенные эпитопы вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н5N1 и В, слитые с фрагментами флагеллина. Анализ аминокислотных последовательностей данного белка с помощью программы ProtParam показал, что гибридный белок стабилен и имеет молекулярную массу 63,6 kDa, pI 6,2.

Создан штамм-продуцент, на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированный вектором pET28a(+)*flu-chim*. С использованием секвенирования показано, что данный вектор в составе штамма несет ген гибридного белка Flu-Chim.

Также была изучена экспрессия гибридного гена *flu-chim* при индукции 0,1; 0,5 и 1 мМ ИПТГ, а также 0,2% лактозой по Штудиеру (рис.). Наблюдала экспрессию гибридного гена *flu-chim* при всех вариантах индукции. Подобран оптимальный по выходу белка и затратам на его осуществление протокол индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim — метод автоиндукции.

Получен высокоочищенный гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim с использованием металлоаффинной хроматографии с Ni-NTA сефарозой (рис.). Выход белка составил 79 мг из одного литра жидкой культуры.

Обсуждение

Вирус гриппа встречается повсеместно, по распространенности занимает ведущее место среди инфекционных болезней человека. В России ежегодно болеют гриппом около 30 млн человек. За последние десять веков человечество подвергалось более чем 130 эпидемиям и пандемиям гриппа. Вирусы гриппа циркулируют во всех частях мира. На данный момент вакцинация признана наиболее эффективным средством профилактики вируса гриппа. Несовершенство и низкая эффективность существующих вакцин побуждает научное сообщество к разработке новых профилактических средств против данного заболевания, характеризующихся в первую очередь универсальностью.

Полученный высокоочищенный гибридный белок включает фрагменты белков Н1, Н3, Н5 вируса гриппа А, а также фрагмент гемагглютинина вируса гриппа В, а также компоненты флагеллина — FliC1 и FliC2 в качестве адьюванта; компоненты соединены гибкими мостиками. Указанные фрагменты белков представляют собой консервативные части гемагглютининов Н1, Н3, Н5 и В, к которым в процессе естественной инфекции образуются

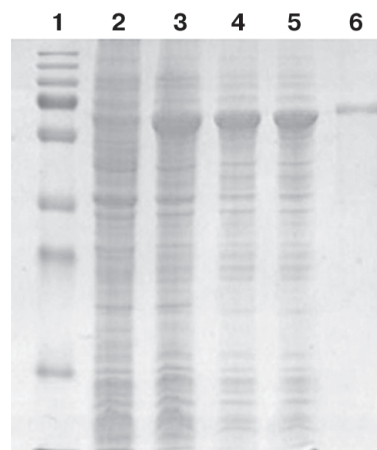


Рисунок. Электрофореграмма результатов индукции экспрессии гена *flu-chim* и хроматографической очистки белка Flu-Chim

Figure. Recombinant Flu-Chim fusion protein expression and purification analysis by SDS PAGE

1. Маркер молекулярных масс (Fermentas)
2. Отрицательный контроль индукции экспрессии гена *flu-chim*
3. Индукция экспрессии гена *flu-chim* 0,2% лактозой
4. Индукция экспрессии гена *flu-chim* 0,5 мМ ИПТГ
5. Индукция экспрессии гена *flu-chim* 1 мМ ИПТГ
6. Препарат очищенного рекомбинантного белка Flu-Chim

специфичные антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов вирусов гриппа А и В. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа.

Использование полученного гибридного рекомбинантного белка при создании кандидатной вакцины против вируса гриппа позволит увеличить ее валентность: после вакцинации у человека возможна выработка специфичного иммунного ответа к различным субтипам вирусов гриппа А и В, как существующим, так и тем, которые могут появиться в результате реассортации нескольких штаммов вируса гриппа.

Целью исследования являлось создание вакцины, которая, наряду с высокой эффективностью, обладала бы относительной безопасностью применения. Для реализации поставленной цели был разработан и создан активный агент кандидатной вакцины против вируса гриппа типов А и В — гибридный рекомбинантный белок Flu-Chim.

Для получения высокоочищенного белка Flu-Chim в больших количествах при малых затратах осуществлен ряд действий.

Получен оптимизированный для высокой экспрессии в клетках *E. coli* ген, кодирующий гибридный белок Flu-Chim. Создан экспрессионный вектор pET-28a(+)-flu-chim.

Создан штамм *E. coli* DH10B/RpET-28a(+)-flu-chim для амплификации вектора, несущего ген *flu-chim*. Создан высокопродуктивный штамм *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a(+)-flu-chim — продуцент белка Flu-Chim. Подобран прото-

кол индукции экспрессии гена, кодирующего гибридный белок Flu-Chim, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах — индукция 0,2% лактозой по Штудьеру. Нароботаны и очищены с использованием металлоаффинной хроматографии образцы рекомбинантного белка Flu-Chim. В дальнейшем планируется оценить иммуногенные и протективные свойства созданного гибридного рекомбинантного белка, что позволит использовать его в составе кандидатной вакцины против вируса гриппа типа А и В.

Список литературы/References

1. Эпидемиологическая ситуация. ФГБУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения России, 2016. [Epidemiologicheskaya situatsiya [Epidemic Situation]. Research Institute of Influenza, Ministry of healthcare of the Russian Federation, 2016]. URL: http://www.influenza.spb.ru/en/influenza_surveillance_system_in_russia/epidemic_situation (05.04.2017)
2. Balaram P., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 299, no. 3, pp. 177–185.
3. Griffin M.R. Influenza vaccination: a 21st century dilemma. *S. D. Med.*, 2013, special no., pp. 110–118.
4. Henry M., Larrinua I.M., Russell S.M. Novel DNA sequences, vectors and proteins of avian influenza hemagglutinin: pat. US20090106864 A1, April 23, 2009.
5. Influenza. Surveillance and monitoring. *World Health Organization*, 2016.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
7. Li S., Zhu W. Influenza-pandemic influenza bivalent combined vaccine and preparation method thereof: pat. CN101524538 A USA.
8. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene*, 1992, vol. 110, no. 1, pp. 89–94.
9. McCullers J.A. The role of punctuated evolution in the pathogenicity of influenza viruses. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 2.
10. 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. *Invitrogen*, 2006.
11. Penghui Y., Xiliang W., Deyan L., Yueqiang D., Li X., Jincheng W. Transdermal immune influenza multivalent vaccine and preparation method thereof: pat. CN101450209 B USA. China.
12. Situation Update: Summary of Weekly FluView Report. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2016.
13. Smith G.E., Volvovitz F., Wilkinson B.E., Hackett C.S. Method for producing influenza hemagglutinin multivalent vaccines using baculovirus: pat. US5762939 A USA.
14. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005. vol. 41, no. 1. pp. 207–234.

Авторы:

Духовлинов И.В., к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
Добровольская О.А., аспирант ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Орлов А.И., д.х.н., генеральный директор ООО «Универсальные биосистемы», Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Director of Science, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;
Dobrovolskaya O.A., PhD Student, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Orlov A.I., PhD, MD (Chemistry), General Director, LLC “Universal Biosystems”, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.02.2017
 Отправлена на доработку 03.03.2017
 Принята к печати 07.04.2017

Received 26.02.2017
 Revision received 03.03.2017
 Accepted 07.04.2017

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ИММУНОГЕННОСТЬ СВЯЗАННОГО С НИМИ БЕЛКА

Д.С. Поляков^{1,2,3}, О.И. Антимонова¹, Р.Г. Сахабеев¹, Н.А. Грудинина¹, А.Е. Ходова³, Е.С. Синицына^{3,4}, В.А. Коржиков-Влах³, Т.Б. Тенникова³, М.М. Шавловский^{1,2}

¹ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследовали иммуногенные свойства белков, связанных с полимерными биodeградируемыми наногранулами. Описан способ получения сферических наногранул размером 20 мкм путем полимеризации молочной кислоты, а также оптимальный способ их поверхностной активации. Активированные наногранулы использованы для ковалентного связывания модельного белка слияния, содержащего последовательности β_2 -микроглобулина человека и зеленого флуоресцентного белка. Показано, что наногранулы способны связывать 3 мкг белка на 1 мг полимера. По данным конфокальной микроскопии и электрофореза, белок прочно сорбируется на поверхности гранул. Мышей линии F1 (СВА х С57BL) внутрибрюшинно иммунизировали наногранулами, модифицированными белком слияния, а также эквивалентной смесью немодифицированных наногранул и свободного белка слияния. Кровь забирали через 2 недели после трехкратной внутрибрюшинной иммунизации. Уровень антител к модельному белку определяли в сыворотке крови мышей при помощи иммуноферментного анализа. Опытная и контрольная группы включали по 39 животных. Достоверность полученных результатов оценивали при помощи критерия Манна–Уитни. Показано, что средний уровень антител в контрольной группе в 1,8 раза превышал таковой в опытной группе. Разница оказалась достоверной ($p < 0,004$). Обсуждается значимость полученных результатов для создания ловушек, способных связывать вирусные частицы в крови и обеспечивать иммунный ответ.

Ключевые слова: частицы на основе полимолочной кислоты, «ловушки» вирусов, зеленый флуоресцентный белок, гуморальный иммунный ответ.

POLYLACTIC ACID NANOPARTICLES INFLUENCE ON IMMUNOGENICITY OF THE PROTEIN BOUND WITH THEM

Polyakov D.S.^{a,b,c}, Antimonova O.I.^a, Sakhabeev R.G.^a, Grudinina N.A.^a, Khodova A.E.^c, Sinitsyna E.S.^{c,d}, Korzhikov-Vlakh V.A.^c, Tennikova T.B.^c, Shavlovsky M.M.^{a,b}

^aInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^bNorth-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

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

^dInstitute of Macromolecular Compound, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. We investigated immunogenic properties of proteins bound with nanoparticles. A process for producing spherical nanoparticles having size of 20 microns by polymerization of lactic acid and an optimal method of nanoparticle surface

Адрес для переписки:

Поляков Дмитрий Степанович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: +7 (950) 039-98-33 (моб.). E-mail: ravendoctor@mail.ru

Contacts:

Dmitry S. Polyakov
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika
Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (950) 039-98-33 (mobile). E-mail: ravendoctor@mail.ru

Библиографическое описание:

Поляков Д.С., Антимонова О.И., Сахабеев Р.Г., Грудинина Н.А., Ходова А.Е., Синицына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Влияние наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 123–129. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129

Citation:

Polyakov D.S., Antimonova O.I., Sakhabeev R.G., Grudinina N.A., Khodova A.E., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M. Polylactic acid nanoparticles Influence on immunogenicity of the protein bound with them // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 123–129. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 14-50-00069) и программы «УМНИК» (№ 7128ГУ/2015)

activation were described. Activated nanoparticles were used for covalent binding of model fusion protein comprising sequences of human beta-2 microglobulin and green fluorescent protein. It is shown that the nanoparticles were able to bind 3 micrograms of the protein per 1 mg of the polymer. According to the results of confocal microscopy and electrophoresis the protein is firmly adsorbed on the surface of the granules. F1 (CBA x C57BL) mice were subjected to intraperitoneal immunization with fusion protein modified nanoparticles and equivalent mixture of unmodified nanoparticles and unbound fusion protein. Blood was taken at 2 weeks after three-time intraperitoneal immunization. Antibody level to model protein was determined in mouse sera using enzyme-linked immunosorbent assay. Each of experimental and control groups comprised 39 animals. The validity of the results was evaluated using the Mann–Whitney test. It is shown that the average antibody level in the control group was 1.8 times greater than that in the experimental group. The difference was significant ($p < 0.004$). We discuss the significance of the results in terms of development traps capable to bind virus particles in blood and to provide immune response.

Key words: PLA-based particles, virus “traps”, green fluorescent protein, humoral immune response.

Введение

Вирусные инфекции характеризуются видо- и тканеспецифичностью, что связано в первую очередь с молекулярными механизмами внедрения вирусных частиц в клетки хозяина. Вирусы для проникновения в клетки, где только и возможна их репродукция, чаще всего используют наружные клеточные рецепторы [8]. Уникальность структуры рецепторов обуславливает избирательность их взаимодействия с вирусными частицами. Эта избирательность, по нашему мнению, может служить основой для создания лекарственных средств, способных связывать вирусные частицы и блокировать их распространение в организме. Для этого предполагается получить биodeградебельные полимерные частицы (сферические наногранулы) с фиксированными размерами, модифицированные фрагментами вирусных рецепторов клеток хозяина. Введение таких частиц в кровотоки может способствовать связыванию циркулирующего вируса и направлению его в макрофаги с последующей деградацией. Деградация в макрофагах, по нашему мнению, может способствовать выработке специфических антител. При этом использование таких наночастиц не зависит от антигенного типа вируса. Таким образом, изменение антигенного типа вируса в ходе инфекции не будет препятствовать применению наночастиц с одним и тем же рецептором. Примером такого вируса может быть вирус гепатита С [2].

Данная работа является частью проекта по созданию «ловушек» вирусных частиц. Создание подобных «ловушек» основано на ковалентной иммобилизации на поверхности нано- или микрочастиц на основе полимолочной кислоты (ПМК) рекомбинантного рецептора, специфического для данного вируса. Предполагается, что полученные конъюгаты белок–частица будут способны к связыванию с вирионами, с последующим поглощением образовавшегося комплекса клетками иммунной системы организма. Значительный интерес

с точки зрения иммунологии представляет выяснение влияния частиц на основе ПМК на иммуногенность связанного с ними белка.

В настоящей статье представлены результаты экспериментов, направленных на изучение влияния конъюгирования белка с полимерными частицами, на его иммуногенность. Для этого использована модельная система, включающая наночастицы из полимолочной кислоты и белок слияния β_2 -микроглобулина с зеленым флуоресцентным белком (β_2 M-sfGFP). Эксперименты проводили на мышах, которым вводили модифицированные наночастицы и контрольные препараты.

Данная работа не только направлена на выяснение степени иммуногенности модифицированных наночастиц, но и носит методический характер, так как для ее реализации пришлось адаптировать и отработать ряд методик.

Материалы и методы

Синтез, выделение и очистка рекомбинантного модельного слитого белка β_2 -микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком. В нашем распоряжении имелась плаزمиды pTRC99a_P7 (Amersham-Pharmacia), кодирующая sfGFP (green fluorescent protein «superfolder»), помещенный под бактериальным промотором. Кроме того, в отделе молекулярной генетики ФГБНУ ИЭМ были созданы экспрессионные генетические конструкции для синтеза в прокариотической системе белка слияния β_2 M-sfGFP [13]. Для получения белков использовали экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Синтез β_2 MSF индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 250 мкМ, и культивирование продолжали в течение ночи при 37°C в условиях аэрации. Бактериальные клетки отделяли от среды культивирования путем центрифугирования в течение 15 мин при 10 000g и однократно отмывали PBS с последующим осаждением. Отмытый клеточный осадок ресуспендировали в растворе, содержа-

шем 10 мМ имидазола и 5 мМ 2-меркаптоэтанола. Клетки разрушали ультразвуком (3 кГц, 3 интервала по 30 с) при охлаждении. После разрушения бактериальных клеток суспензию центрифугировали, и профильтрованный через бумажный фильтр супернатант подвергали хроматографической очистке на металл-хелатном никель-агарозном сорбенте (Sigma), согласно стандартному протоколу производителя.

Получение частиц. Частицы на основе ПМК получали методом одинарной эмульсии по методике, аналогичной описанной ранее [11]. 300 мг ПМК (молекулярная масса 15 000–30 000) растворяли в 7,5 мл дихлорметана (4 масс./об.%), содержащего 50 мг лецитина. Полученную «масляную» фазу диспергировали в 75 мл охлажденного льдом водного раствора додецилсульфата натрия (1 масс.%) и Lutrol F-68 (5 масс.%) с применением ультразвукового диспергатора (Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия) и магнитной мешалки (MR Hei-Mix S, Heidolph, Германия) при скорости перемешивания 750 об./мин. Полученную эмульсию разбавляли в 250 мл охлажденного льдом 1 масс.% водного раствора поливинилового спирта (молекулярная масса 70 000). Дихлорметан удаляли испарением с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Heidolph, Германия) при остаточном давлении 100 мБар в течение 2–3 ч. Образовавшиеся частицы выделяли центрифугированием при 10 000g и промывали водой.

Связывание флуоресцирующего белка с полимерными частицами на основе полимолочной кислоты. На первом этапе производили активацию частиц. Генерировали карбоксильные группы на поверхности частиц за счет их обработки 0,1 М раствором NaOH: навеску частиц помещали в пластиковую центрифужную пробирку, прибавляли 0,1 М раствор NaOH, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. После этого частицы 4–5 раз промывали водой (центрифугуя раствор и отбирая надосадочную жидкость).

Следующим этапом связывания являлась активация карбоксильных групп на поверхности частиц с помощью N-гидроксисбензотриазола (HOBT) и гидрохлорида (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (CDI). Реакцию проводили в 0,05 М буферном растворе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,6. После этого частицы пятикратно промывали водой, центрифугуя и отбирая надосадочную жидкость.

Далее осуществляли связывание на поверхности частиц флуоресцентного белка. В 0,1 М боратном буферном растворе, pH 8,4, растворяли белок, перемешивали и выдерживали рас-

твор при комнатной температуре 15–20 мин, далее этот раствор добавляли к частицам, перемешивали на качалке при комнатной температуре 2 ч. Затем частицы пятикратно промывали водой, центрифугуя и отбирая надосадочную жидкость.

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000. Измерение производили непосредственно в капле (2 мкл) жидкости. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм.

Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез проводили в горизонтальных блоках 0,8% агарозного геля. Контроль миграции белков и наночастиц осуществляли по флуоресценции при возбуждении флуоресценции с использованием трансиллюминатора.

Иммунизация и получение сыворотки крови мышей. В ходе экспериментов использовали самок-гибридов F1 (CBA x C57BL) массой в среднем 20–25 г (возраст 4–6 месяцев). Животных содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 ч. Корм и вода предоставлялись *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ мышам внутрибрюшинно вводили препараты, приготовленные на физиологическом растворе (0,14 М раствор NaCl) в объеме 0,4 мл на животное. Адьюванты и другие вещества, повышающие иммуногенность, не использовали. Таким образом, было проведено 3 иммунизации с интервалами по 2 недели. Забор крови мышей осуществляли из щечной вены через 13 дней после третьей иммунизации, для чего использовали скарификаторы одноразовые стерильные с боковым копьём (МИЗ Медбелрос, Республика Беларусь).

Иммуноферментный анализ. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл 0,05% раствора глутарового альдегида в PBS. Инкубацию проводили при 37°C в течение 1 ч. Удаляли из лунок глутаровый альдегид, и в лунки одной половины планшета вносили по 100 мкл раствора sfGFP в PBS с концентрацией 5 мкг/мл, а в лунки другой половины — PBS. Инкубировали при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов (Biosan, Латвия) в течение 1 ч. В лунки планшета вносили по 200 мкл 3% раствора обезжиренного молока (Fluka, США) в PBS с добавлением 0,5% Tween 20 (PBST) для блокирования неспецифического связывания. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 ч. В лунки планшета вносили сыворотки крови мышей в 3% растворе молока в PBST в различных разведениях. Каждую сыворотку вносили в трех или двух

разведениях (1:2000, 1:1000 и 1:500 или 1:1000 и 1:500) в двух повторностях на каждую половину планшета в объеме 100 мкл на лунку. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 ч. Лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST при помощи автоматического планшетного промывателя (Bio-Rad, США). В лунки планшета вносили специфические вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat anti Mouse-HRP, Abscam, Великобритания), в разведении 1:50 000 в 3% растворе молока в PBST в количестве 100 мкл на лунку. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 часа. Лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST. В лунки планшета вносили по 100 мкл проявителя, приготовленного следующим образом: 5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитрила. Далее доводили объем до 11 мл 0,1 М цитрат-фосфатным буфером, pH 4,0. Непосредственно перед внесением в планшет в раствор проявителя добавляли 1 мкл 30% H₂O₂ с конечной концентрацией 0,0027%. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 10 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 1 М H₂SO₄ и встряхивали планшет на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 мин. Измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

Статистическая обработка. Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями. При построении рисунка использовали программу Statistica 6.0. Для подтверждения статистически значимых различий между группами использовали критерий Манна–Уитни.

Исследование полученного конъюгата наночастиц и B2MSF при помощи конфокальной микроскопии. Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом C-Apochromat 40x/1.2 W Korr UV-VIS-IR M27. Флуоресценцию β_2 M-sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флуоресценции лазером с длинной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста. Обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «LSM 510».

Результаты

В качестве модели для выяснения влияния наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка был выбран созданный нами ранее [12, 13] рекомбинантный белок слияния β_2 -микроглобулина человека и зеленого флуоресцентного белка (β_2 M-sfGFP). Преимущество данного белка состоит в том, что он, во-первых, синтезируется и выделяется при помощи доступных стандартных методов. Во-вторых, обладает флуоресценцией, свойственной зеленому флуоресцентному белку. Это создает удобство работы за счет возможности измерять количество белка не только по поглощению при 280 нм, но и по поглощению при 490 нм, а также по флуоресценции, которую можно оценивать флуоресцентной микроскопией. Указанные преимущества зеленых белков использовались в нашей работе ранее [5]. Такими свойствами обладает и сам зеленый флуоресцентный белок (GFP), однако попытки связывания его с наночастицами не привели к приемлемым результатам. По-видимому, это связано с компактной структурой молекулы GFP [9]. При этом добавление аминокислотной последовательности β_2 -микроглобулина к последовательности GFP не нарушает способности к флуоресценции, но существенно облегчает связывание с наночастицами. Это связано с тем, что аминогруппа у зеленого белка, возможно, «упакована» внутри сложной структуры данного белка. β_2 -микроглобулин играет роль «мостика» между наночастицами и зеленым белком. Это обстоятельство является третьей из перечисляемых причин, по которым β_2 M-sfGFP в итоге выбран нами в качестве модельного белка в описываемых экспериментах. В-четвертых, в нашем коллективе есть опыт работы с β_2 -микроглобулином [1, 3, 4, 6, 7], что было важно при планировании большого числа последовательных действий, необходимых для реализации поставленной задачи.

Был получен в достаточном количестве и очищен модельный β_2 M-sfGFP (рис. 1). Рекомбинантный белок получали из клеток *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных экспрессионной конструкцией pTRCb2msf [12, 13]. В результате для данной работы было синтезировано и очищено 23 мг целевого белка из 3 л бактериальной культуры.

Результаты электрофоретического разделения белка sfGFP, белка слияния β_2 M-sfGFP, немодифицированных наночастиц в агарозном геле представлены на рисунке 1.

Белок слияния β_2 M-sfGFP, также как и контрольный белок, обладает флуоресцентными свойствами. Наночастицы в гель не проходят (дорожка 1). На дорожке 1 не видно бендов, со-

ответствующих зеленым белкам, следовательно, препарат наночастиц не содержит несвязавшегося целевого белка.

В качестве основы для создания наночастиц использовали полимолочную кислоту. Получение частиц на основе синтезированного полимера осуществляли с использованием метода одинарной эмульсии в Институте высокомолекулярных соединений РАН. Образовавшиеся частицы имели сферическую форму и диаметр от 200 нм до 20 мкм. Была проведена активация поверхности частиц (генерирование на поверхности полимерных частиц карбоксильных групп и их активация); связывание белка с поверхностью частиц и очистка полученного конъюгата. В результате полученные конъюгаты наночастиц и β_2 M-sfGFP имели диаметр до 10 мкм, в редких случаях до 20 мкм и обладали зеленой флуоресценцией (рис. 2, III обложка). Методом спектрофотометрии была установлена связывающая способность наночастиц по отношению к белку β_2 M-sfGFP, она составляла 3 мкг белка на 1 мг наночастиц.

Была осуществлена лазерная сканирующая микроскопия (ЛСМ) препарата наночастиц, не имеющих на своей поверхности белков слияния. При этом свечения обнаружено не было (рис. 3, III обложка). Также при помощи ЛСМ нами были зарегистрированы флуоресцирующие структуры конъюгата наночастиц с белком слияния β_2 M-sfGFP, представленные на рисунке 2.

Полученные результаты свидетельствует о связывании наночастиц с модельным белком. Свечение образует именно конъюгат наночастиц с β_2 M-sfGFP, а не сами частицы. Зеленый белок, связанный с наночастицами, не теряет способности к флуоресценции.

Была проведена иммунизация 78 мышей, разделенных на 2 равные по численности группы. Группе «Опыт» внутрибрюшинно вводили конъюгат наночастиц и β_2 M-sfGFP из расчета 1 мкг белка на иммунизацию одной мыши. Группе «Контроль» аналогично вводили смесь, содержащую 1 мкг несвязанного β_2 M-sfGFP и соответствующее количество немодифицированных наночастиц. Через 2 недели после третьей иммунизации получали образцы венозной крови всех мышей. Титр антител против модельного белка в сыворотках определяли посредством иммуноферментного анализа.

Для учета фонового сигнала, обусловленного неспецифическими взаимодействиями первых и вторых антител, из сигналов лунок, содержащих антиген sfGFP, вычитали сигналы соответствующих лунок, которые sfGFP не содержали.

В результате статистической обработки данных ИФА (рис. 4, табл.) выяснилось, что в группе мышей «Опыт» содержание иммуноглобу-

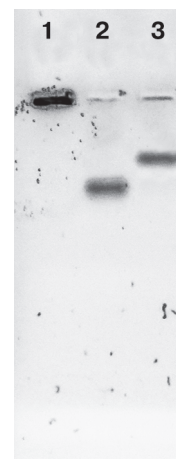


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение модифицированных зеленым белком наночастиц (дорожка 1), белка sfGFP (дорожка 2), белка слияния β_2 M-sfGFP (дорожка 3) в 0,5% агарозном геле

Figure 1. Nanoparticles modified by green protein (path 1), sfGFP (path 2), a merge protein β_2 M-sfGFP (path 3) in 0,5% agarose gel electrophoretic analysis

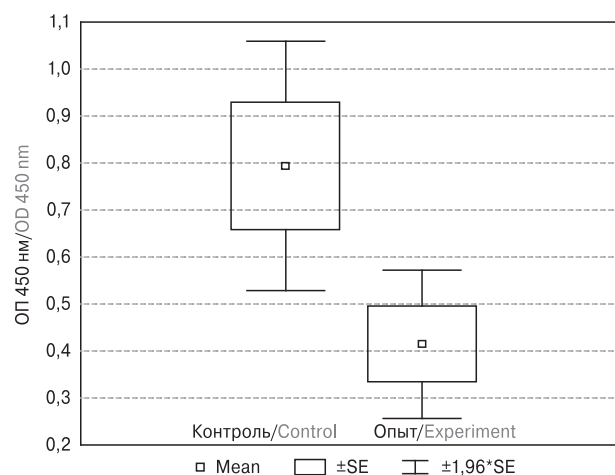


Рисунок 4. Результаты ИФА иммуноглобулинов против модельного белка в сыворотках крови мышей

Figure 4. Antibodies against the model protein in mice blood serum ELISA results

Mean — полученные средние значения;
SE — ошибка возведенного в квадрат среднего значения.
Mean — the mean values obtained;
SE — error squared average value.

Таблица. Сравнение групп «Опыт» и «Контроль» с использованием критерия Манна–Уитни

Table. Comparison of the “Test” and “Control” groups by the Mann–Whitney U-test

Сумма/Sum Контроль/Control	Сумма/Sum Опыт/Test	U	Z	p
6228,5	4649,5	1948,5	2,9	0,0036

линов против модельного белка было значительно ниже, чем в группе «Контроль». При этом следует отметить значительное различие в содержании иммуноглобулинов между группами, а также высокую статистическую достоверность ($p < 0,004$) данного различия.

Обсуждение

Результаты экспериментов показали, что более выраженный ответ в плане количественного содержания антител в сыворотке крови имеет место в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных наночастиц. Этот результат можно объяснить следующим образом. Возможно, наночастицы элиминируются из брюшной полости в результате их захвата макрофагами. Макрофаги, обеспечивая деградацию связанных с наночастицами белков, способствуют представлению антигенных детерминант В-лимфоцитам с последующим антительным ответом. Такой сценарий, скорее всего, имеет место после первой иммуниза-

ции. При последующих иммунизациях захват наночастиц макрофагами может, напротив, ослаблять поступление антигена в лимфоциты и, таким образом, снижать эффективность секреции антител лимфоцитами. Иммунизация растворимым антигеном, возможно, менее эффективна после первой внутрибрюшинной иммунизации, но способствует более эффективной секреции антител после повторных иммунизаций. Так как в наших экспериментах анализ содержания антител производился после третьей иммунизации, то, вполне вероятно, что первый этап иммунизации мы просто не увидели.

Аналогичных работ, описывающих влияние наночастиц на иммуногенность, крайне мало. В работе Chong C.S. et al. [10] было установлено, что более сильный иммунный ответ у мышей вызывал препарат, содержащий модельный белок (Hbc-Ag). Менее иммуногенной была неконъюгированная смесь наночастиц и белка. И наименьший иммунный ответ вызывал конъюгат наночастиц и белка.

Список литературы/References

1. Антимоннова О.И., Грудинина Н.А., Егоров В.В., Поляков Д.С., Ильин В.В., Шавловский М.М. Взаимодействие красителя конго красный с фибриллами лизоцима, бета-2-микроглобулина и транстиретаина // Цитология. 2016. Т. 58, № 2. С. 156–163. [Antimonova O.I., Grudinina N.A., Egorov V.V., Polyakov D.S., Ijlin V.V., Shavlovsky M.M. Interaction of the dye congo red with fibrils of lysozyme, beta-2-microglobulin and transthyretin. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*, 2016, vol. 58, no. 2, pp. 156–163. (In Russ.)]
2. Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. Молекулярная биология вируса гепатита С // Успехи биологической химии. 2005. Т. 45. С. 37–86. [Ivanov A.V., Kuzyakin A.O., Kochetkov S.N. Molecular biology of hepatitis C virus. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii = Biological Chemistry Reviews*, 2005, vol. 45, pp. 37–86. (In Russ.)]
3. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Бета-2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета-2-микроглобулинов человека // Медицинский академический журнал. 2010. Т. 10, № 2. С. 40–49. [Polyakov D.S., Grudinina N.A., Solovyov K.V., Egorov V.V., Sirotkin A.K., Aleinikova T.D., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Beta-2-microglobuline amyloidosis: fibrillogenesis of natural and recombinant human beta-2-microglobulines. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 40–49. (In Russ.)]
4. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Получение рекомбинантного β 2-микроглобулина человека и его фибриллогенез при низких и нейтральных значениях pH // Молекулярная медицина. 2011. № 2. С. 36–39. [Polyakov D.S., Grudinina N.A., Solovyov K.V., Egorov V.V., Sirotkin A.K., Aleinikova T.D., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Production of recombinant human β 2-microglobulin and its amyloid fibril formation at acidic and neutral pH. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2011, no. 2, pp. 36–39. (In Russ.)]
5. Поляков Д.С., Сахабеев Р.Г., Шавловский М.М. Частичная денатурация рекомбинантного белка для его аффинного выделения // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52, № 1. С. 122–127. [Polyakov D.S., Sakhabeyev R.G., Shavlovsky M.M. Partial denaturation of recombinant protein for affinity purification. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2016, vol. 52, no. 1, pp. 122–127. (In Russ.)]
6. Поляков Д.С., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Получение природного бета-2-микроглобулина человека // Молекулярная медицина. 2010. № 6. С. 39–43. [Polyakov D.S., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Isolation of native human β -2-microglobulin. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2010, no. 6, pp. 39–43. (In Russ.)]
7. Поляков Д.С., Шавловский М.М. Молекулярные основы β 2-микроглобулинового амилоидоза // Медицинский академический журнал. 2014. Т. 14, № 1. С. 24–41. [Polyakov D.S., Shavlovsky M.M. Molecular basis of β 2-microglobulin amyloidosis. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 24–41. (In Russ.)]
8. Berka U., Hamann M.V., Lindemann D. Early events in foamy virus — host interaction and intracellular trafficking. *Viruses*, 2013, vol. 5, pp. 1055–1074.
9. Bulina M.E., Chudakov D.M., Mudrik N.N., Lukyanov K.A. Interconversion of anthozoa GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis. *BMC Biochem.*, 2002, vol. 3, p. 7.
10. Chong C.S., Cao M., Wong W.W., Fischer K.P., Addison W.R., Kwon G.S., Tyrrell D.L., Samuel J. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control Release*, 2005, no. 102 (1), pp. 85–99. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.09.014

11. Korzhikov V., Averianov I., Litvinchuk E., Tennikova T. Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release. *J. Microencapsul.*, 2016, vol. 33 (3), pp. 199–208. doi: 10.3109/02652048.2016.1144818
12. Solovyov K.V., Kern A.M., Grudinina N.A., Aleynikova T.D., Polyakov D.S., Morozova I.V., Shavlovsky M.M. Genetic structures and conditions of their expression, which allow receiving native recombinant proteins with high output. *Int. J. Biomed.*, 2012, vol. 2, iss. 1, pp. 45–49.
13. Solovyov K.V., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Egorov V.V., Morozova I.V., Aleynikova T.D., Shavlovsky M.M. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins TTR-sfGFP and β 2M-sfGFP. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2011, vol. 41, iss. 4, pp. 337–349.

Авторы:

Поляков Д.С., к.м.н., научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; ассистент кафедры медицинской генетики СЗГМУ им. И.И. Мечникова ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Антимонова О.И., младший научный сотрудник и аспирант отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Сахабеев Р.Г., аспирант отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Грудина Н.А., к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ходова А.Е., студентка 6-го курса магистратуры ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Синицына Е.С., к.х.н., научный сотрудник межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ФГБНУ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Коржиков-Влах В.А., к.х.н., доцент межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Теникова Т.Б., д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, зав. межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Шавловский М.М., д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики человека отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры медицинской генетики СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Polyakov D.S., PhD (Medicine), Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Medical Genetics, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Interdepartmental Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Antimonova O.I., Junior Researcher and PhD Student, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Sakhabeev R.G., PhD Student, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Grudinina N.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Khodova A.E., Masters Degree Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Sinitsyna E.S., PhD (Chemistry), Researcher, Interdepartmental Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Laboratory of Polymer Sorbents and Carriers for Biotechnology, Institute of Macromolecular Compound, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

Korzhikov-Vlakh V.A., PhD (Chemistry), Associate Professor, Interdepartmental Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Tennikova T.B., PhD, MD (Chemistry), Professor, Head Researcher, Head of the Interdepartmental Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Shavlovsky M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Medical Genetics, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.03.2016
Отправлена на доработку 20.04.2016
Принята к печати 20.01.2017

Received 08.03.2016
Revision received 20.04.2016
Accepted 20.01.2017

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА, ФОСФОРНОКАЛЬЦИЕВОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА НА РИСК РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ЭНДОКАРДИТА

А.В. Понасенко¹, А.Г. Кутихин¹, М.В. Хуторная¹, Н.В. Рутковская¹,
Н.В. Кондюкова¹, Ю.Н. Одаренко¹, Я.В. Казачек¹, А.В. Цепочкина¹, А.Е. Южалин²,
Л.С. Барбараш¹, О.Л. Барбараш¹

¹ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия

²Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, г. Оксфорд, Соединенное Королевство
Великобритании и Северной Ирландии

Резюме. Инфекционный эндокардит (ИЭ) представляет собой септическое воспаление эндокарда, как правило, бактериальной этиологии. Несмотря на определенные успехи в терапии ИЭ, смертность от этого заболевания все еще остается достаточно высокой, особенно в группах риска. Это требует развития новых эффективных подходов к профилактике ИЭ; один из таких подходов основывается на принципах персонализированной медицины. Известно, что распознавание микробных структур, цитокиновый и острофазовый ответ, особенности гемостаза и изменения липидного и кальциевого профиля плазмы крови играют определенную роль в патогенезе и клиническом течении ИЭ. Было предположено, что врожденные генетические различия вышеуказанных процессов могут определять индивидуальную восприимчивость к развитию ИЭ. Для проверки данной гипотезы были выделены образцы ДНК 124 пациентов с ИЭ и 300 асимптоматичных субъектов, схожих с пациентами по полу, возрасту (± 6 лет) и этнической принадлежности. Далее проводилось генотипирование по 35 функционально значимым полиморфизмам 22 отобранных по оригинальному алгоритму генов с последующим генетико-эпидемиологическим анализом. Генотипирование проводилось по технологии TaqMan (аллель-специфичная полимеразная цепная реакция с детекцией результата в реальном времени), генетико-эпидемиологический анализ осуществлялся посредством программы SNPStats. Было обнаружено, что генотип G/A полиморфизма rs1143634 гена IL1B, генотип G/T полиморфизма rs3212227 гена IL12B, генотип A/G полиморфизма rs1130864 гена CRP и аллель G полиморфизма rs1801197 гена CALCR ассоциированы со сниженным риском развития ИЭ, в то время как генотип T/T полиморфизма rs1205 гена CRP, напротив, был связан с повышенной вероятностью возникновения данной патологии. Более того, гетерозиготные генотипы полиморфизмов rs1143634 и rs3212227 были ассоциированы с повышенным уровнем IL-1 β и IL-12 в плазме крови, что указывает на значимость данных воспалительных молекул для этиопатогенеза ИЭ. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что врожденные генетические различия в путях цитокинового и острофазового ответа, а также метаболизма кальция могут быть связаны с развитием ИЭ.

Адрес для переписки:

Понасенко Анастасия Валериевна
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6,
НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.
Тел.: 8 951 591-05-50 (моб.).
E-mail: avapanass@mail.ru

Contacts:

Anastasia V. Ponasenko
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy avenue, 6,
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.
Phone: +7 951 591-05-50 (mobile).
E-mail: avapanass@mail.ru

Библиографическое описание:

Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Рутковская Н.В.,
Кондюкова Н.В., Одаренко Ю.Н., Казачек Я.В., Цепочкина А.В.,
Южалин А.Е., Барбараш Л.С., Барбараш О.Л. Влияние полиморфизмов
генов иммунного ответа, фосфорнокальциевого и липидного обмена
на риск развития инфекционного эндокардита // Инфекция и иммунитет.
2017. Т. 7, № 2. С. 130–140. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-130-140

Citation:

Ponasenko A.V., Kutikhin A.G., Khutorная M.V., Rutkovskaya N.V.,
Kondyukova N.V., Odarenko Yu.N., Kazachek Ya.V., Tsepokina A.V., Yuzhalin A.E.,
Barbarash L.S., Barbarash O.L. Polymorphisms within innate immune
response, calcium metabolism and lipid metabolism are predictors of infective
endocarditis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2017, vol. 7, no. 2, pp. 130–140. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-130-140

Особенно значимыми в этом отношении могут быть однонуклеотидные полиморфизмы в генах IL1B и IL12. Тем не менее, для детального выявления генетических основ наследственной восприимчивости к ИЭ необходимы дальнейшие молекулярно-эпидемиологические исследования.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, однонуклеотидные полиморфизмы, предиктивные маркеры, IL-1 β , IL-12, C-реактивный белок.

POLYMORPHISMS WITHIN INNATE IMMUNE RESPONSE, CALCIUM METABOLISM AND LIPID METABOLISM ARE PREDICTORS OF INFECTIVE ENDOCARDITIS

Ponassenko A.V.^a, Kutikhin A.G.^a, Khutornaya M.V.^a, Rutkovskaya N.V.^a, Kondyukova N.V.^a, Odarenko Yu.N.^a, Kazachek Ya.V.^a, Tsepokina A.V.^a, Yuzhalin A.E.^b, Barbarash L.S.^a, Barbarash O.L.^a

^a Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

^b Department of Oncology, Cancer Research UK and Medical Research Council Oxford Institute for Radiation Oncology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Abstract. Infective endocarditis (IE) is a septic inflammation of the endocardium generally caused by bacteria. Despite certain advances in treatment, case fatality rate and mortality of IE are still relatively high, particularly in high-risk groups. This requires the development of novel efficient preventive approaches; one of them is a personalized medicine. Recognition of microbial patterns, cytokine and acute phase responses, hemostasis features and alterations in plasma lipid and calcium profile all have been reported to affect pathogenesis and clinical course of IE. We hypothesized that inherited genomic variation in the abovementioned pathways may determine individual susceptibility to IE. Having recruited 124 patients with IE and 300 age-, sex-, and ethnicity-matched healthy controls, we profiled their genomic DNA for 35 functionally significant polymorphisms within the 22 selected genes involved in pathways mentioned above, with the further genetic association analysis. Genotyping was performed using TaqMan allelic discrimination assay while statistical analysis was carried out utilizing SNPStats, a web tool for genetic association analysis. We found that the G/A genotype of the rs1143634 polymorphism within the IL1B gene, the G/T genotype of the rs3212227 polymorphism within the IL12B gene, the A/G genotype of the rs1130864 polymorphism within the CRP gene, and the G allele of the rs1801197 polymorphism within the CALCR gene are associated with a decreased risk of IE whereas the T/T genotype of the rs1205 polymorphism within the CRP gene is associated with a higher risk of IE. Furthermore, heterozygous genotypes of the rs1143634 and rs3212227 polymorphisms were associated with the higher plasma levels of IL-1 β and IL-12, respectively, suggesting their possible importance for IE development. Our results indicate that inherited variation in the cytokine, acute phase response, and calcium metabolism pathways may be linked to IE. However, further molecular epidemiology studies are needed to thoroughly uncover the genetic basis of IE.

Key words: infective endocarditis, single nucleotide polymorphisms, predictive markers, IL-1 β , IL-12, C-reactive protein.

Введение

Инфекционный эндокардит (ИЭ) представляет собой инфекцию, поражающую нативные или протезные клапаны сердца, межжелудочковую перегородку, сухожильные хорды и поверхности внутрисердечных устройств [19]. Как правило, ИЭ вызывается бактериями, особенно родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus* [6], однако также встречаются случаи ИЭ, вызванного грибами [26]. Наиболее распространенными симптомами ИЭ являются недомогание, усталость, кашель, озноб, лихорадка и потеря массы в сочетании с сердечными шумами [19]. К прочим симптомам ИЭ относятся анемия, судороги, ночная потливость, увеличение селезенки, аномальный цвет мочи, пятна Рота, узелки Ослера, боль в суставах, пятна Джейнуэя или иные кровоизлияния, септическая эмболия и инфаркт различных органов [19]. Частота ИЭ в различных странах существенно варьирует (от 1,5 на 100 000 населения в Нидерландах до 11,6 на 100 000 населения в США), со средней летальностью в 25% [3]. В то же время леталь-

ность зависит от этиологического агента: от 10% у пациентов со стрептококковым ИЭ до 40% у пациентов со стафилококковым ИЭ [7, 20, 27, 29, 34]. Более того, в группах риска летальность может достигать и 70% [29]. Развитие и клиническое течение ИЭ могут зависеть от: 1) опознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, цитокинового и острофазового ответа [16, 25, 35]; 2) гемостаза [5, 21, 24]; 3) липидного [13, 22] и кальциевого профиля плазмы крови [30, 32]. Концептуально процессы воспаления, окисления липидов, кальцификации и гемостаза в настоящее время рассматриваются как взаимосвязанные в рамках иммуновоспалительного континуума, одним из конечных звеньев которого является кальцификация нативных и протезных клапанов сердца, ведущая к клапанной деструкции и недостаточности [28].

Развитие технологий генотипирования привело к выполнению множества исследований по связи генных полиморфизмов с различными заболеваниями [38]. Полиморфизмы, локализованные в различных участках генома, могут модулировать: 1) инициацию транскрипции;

2) сплайсинг мРНК; 3) фолдинг, стабильность и экспрессию белков; 4) посттрансляционные модификации [2]. Ранее нашей группой было показано, что генотип С/С полиморфизма rs3775073 гена TLR6 ассоциирован с двукратно сниженным риском развития ИЭ; иные же полиморфизмы генов опознавания паттернов не имели предиктивной ценности [16]. Целью данного исследования было выявить, связаны ли полиморфизмы генов цитокинового и острофазового ответа, метаболизма липидов и метаболизма кальция с индивидуальной восприимчивостью к ИЭ.

Материалы и методы

Популяция. Критериями включения были: 1) проживание в Кемеровской области в течение как минимум двух поколений; 2) принадлежность к русскому этносу; 3) клинически (по модифицированным критериям Дьюка при наличии как минимум одного большого и одного малого критериев или трех малых критериев [18]) и гистологически верифицированный диагноз ИЭ; 4) подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения были: 1) принадлежность к коренным или пришлым этносам; 2) злокачественные новообразования в анамнезе; 3) сопутствующие психические и/или аутоиммунные заболевания;

4) наркомания; 5) отказ подписать информированное согласие на участие в исследовании. Все пациенты прошли курс антибиотикотерапии в острой фазе при первичном поступлении в учреждение здравоохранения по месту жительства в соответствии с Европейскими рекомендациями [18]. Антибиотикотерапия и лечение всех сопутствующих заболеваний также проводилось в предоперационном периоде в клинике ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ).

Всего было набрано 162 пациента с ИЭ, поступивших в НИИ КПССЗ с 2009 по 2016 гг. После исключения 38 пациентов согласно приведенным выше критериям, в исследование было включено 124 пациента (табл. 1). Контрольную группу составили 300 асимптоматичных доноров крови, спаренных с пациентами по полу, возрасту (± 6 лет) и этнической принадлежности, а также не имеющих наркомании, сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований, аутоиммунных и психических заболеваний в анамнезе. Характеристики ИЭ у включенных в исследование пациентов приведены в таблице 2. Протокол исследования был утвержден локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в исследовании после полного объяснения им его протокола.

Таблица 1. Характеристики изучаемой популяции

Table 1. Characteristics of the studied population

	Асимптоматичные доноры крови Control group	Пациенты Patients	Всего Total	P
Количество субъектов/Number of subjects	300 (70,92%)	123 (29,07%)	423 (100,00%)	
Медиана возраста с 95% доверительным интервалом/Median age with 95% confidence interval	55,00 (53,00–56,00)	50,00 (48,00–53,00)	53,00 (52,00–55,00)	0,12
Межквартильный размах/Interquartile range	44–62	37–59	42–61	
Мужчины/Males	190 (63,00%)	77 (63,00%)	267 (63,12%)	0,99
Женщины/Females	110 (37,00%)	46 (37,00%)	156 (36,88%)	

Таблица 2. Характеристики пациентов с инфекционным эндокардитом

Table 2. Characteristics of the patients with infective endocarditis

Тип инфекционного эндокардита Type of infective endocarditis	Локализация Location	Пораженный клапан сердца Valve involved
Первичный Native (93/123, 75,61%)	Левосторонний Left-sided (116/123, 94,31%)	Аортальный/Aortic (45/123, 36,58%)
		Митральный/Mitral (62/123, 50,41%)
		Аортальный и митральный/Aortic and mitral (9/123, 7,31%)
Протезный Prosthetic (30/123, 24,39%)	Правосторонний Right-sided (6/123, 4,88%)	Трикуспидальный/Tricuspid (6/123, 4,88%)
Устройства Device (0/123, 0,0%)	Двусторонний Double-sided (1/123, 0,81%)	Митральный и трикуспидальный/Mitral and tricuspid (1/123, 0,81%)

Отбор полиморфизмов и генотипирование. Использовались четыре основных критерия отбора генных полиморфизмов: 1) локализация в генах цитокинового и острофазового ответа, гемостаза, метаболизма липидов или фосфорнокальциевого обмена; 2) частота минорного аллеля в русской популяции $\geq 5\%$ по данным HarMap; 3) функциональные последствия, приводящие к изменению экспрессии соответствующих белков; 4) малое количество или отсутствие исследований роли того или иного полиморфизма в развитии ИЭ. Для отбора полиморфизмов использовались базы данных dbSNP, SNPinfo и SNPnexus [10, 37]. Всего было отобрано 35 полиморфизмов в 22 генах (табл. 3).

Выделение ДНК и генотипирование проводилось аналогично предыдущим работам нашей научной группы [15, 16, 23, 28]. В таблице 3 приведены специфичные праймеры для генотипирования. Лабораторный персонал не знал, к какой группе принадлежат пациенты, и 10% всех образцов ДНК генотипировалось повторно с целью контроля качества.

Измерение уровня цитокинов в плазме крови. Периферическая венозная кровь забиралась у пациентов при поступлении в стационар и через 7 дней после операции. Плазму крови получали центрифугированием в течение 15 мин при 1780g и -4°C ; аликвоты объемом 300 мкл хранились при -80°C до проведения измерения. Уровень IL-1 β , IL-12 и С-реактивного белка в плазме крови был измерен при помощи иммуноферментного анализа с использованием соответствующих наборов фирмы eBioscience (каталожные номера BMS 224/2, BMS238CE и 88-7502-28 соответственно) согласно инструкциям производителя. Все измерения проводились в дублях с использованием средних концентраций для статистического анализа.

Статистический анализ проводился аналогично предыдущим работам нашей научной группы [15, 16, 23, 28] с применением программ GraphPad Prism (GraphPad Software) и SNPStats [31].

Результаты

Результаты анализа генетических ассоциаций с поправками на пол и возраст приведены в таблице 4. В отношении генов цитокинового и острофазового ответа было обнаружено, что генотип G/A полиморфизма rs1143634 гена IL1B ассоциирован со сниженным риском развития ИЭ (ОШ = 0,43, 95% ДИ = 0,26–0,71, $p = 0,0016$, сверхдоминантная модель наследования). Кроме того, генотип G/T полиморфизма rs3212227 гена IL12B был также связан с меньшей вероятностью возникновения ИЭ (ОШ = 0,57, 95% ДИ = 0,34–0,94, $p = 0,0250$, сверхдоминантная модель наследования). Наконец, генотип A/G полиморфизма rs1130864 гена CRP был также связан со сниженным риском развития ИЭ (ОШ = 0,54, 95% ДИ =

0,34–0,86, $p = 0,0083$, сверхдоминантная модель наследования). Напротив, генотип T/T полиморфизма rs1205 гена CRP был ассоциирован с повышенной вероятностью возникновения ИЭ (ОШ = 2,42, 95% ДИ = 1,32–4,43, $p = 0,0047$, рецессивная модель наследования).

Далее было исследовано, могут ли наследственные различия в путях гемостаза, метаболизма липидов и метаболизма кальция влиять на риск развития ИЭ. Генотип A/G полиморфизма rs13290979 гена NOTCH1 и аллель G полиморфизма rs1801197 гена CALCR были ассоциированы с сниженным риском ИЭ (OR = 0,54, 95% ДИ = 0,34–0,84, $p = 0,0062$, доминантная модель наследования; ОШ = 0,56, 95% ДИ = 0,38–0,82, $p = 0,0020$, лог-аддитивная модель наследования соответственно).

По каким-либо другим изученным полиморфизмам статистически значимых различий выявлено не было.

Поскольку цитокины легко могут быть обнаружены в крови, были исследованы функциональные последствия четырех полиморфизмов, достигших статистической значимости, в генах IL1B, IL12 и CRP. Был измерен уровень данных белков в плазме крови пациентов с ИЭ сразу после поступления в стационар и через 7 дней после операции (рис.). Генотип G/A полиморфизма rs1143634 гена IL1B и генотип G/T полиморфизма rs3212227 гена IL12B были ассоциированы с повышенным уровнем IL-1 β и IL-12 в плазме крови на обеих временных точках. В то же время для С-реактивного белка подобной зависимости выявлено не было.

Обсуждение

Несмотря на достигнутые успехи в диагностике и лечении [6, 19], генетические основы восприимчивости к ИЭ остаются неясными. В пионерской работе Vollmer с соавт. выявили, что аллель G полиморфизма rs2232596 и аллель T полиморфизма rs2232582 гена LBP ассоциированы с повышенным риском ИЭ [33]. Известно, что при ИЭ липополисахарид-связывающий белок выделяется в системный кровоток в острую фазу воспаления [30]. Последующие исследования Daga с соавт. [8, 9] и Durante-Mangoni с соавт. [11] не выявили связи между полиморфизмами генов гемостаза (PTN, FV, GPIb, GPIIa, Fc γ RIIa) и ИЭ. В нашей предыдущей работе генотип C/C полиморфизма rs3775073 гена TLR6 был идентифицирован как протективный фактор [16], в то время как Bustamante с соавт. предположили, что аллель A полиморфизма rs5743708 гена TLR2 является фактором риска ИЭ [4]. В данной работе нами было обнаружено, что генотип G/A полиморфизма rs1143634 гена IL1B, генотип G/T полиморфизма rs3212227 гена IL12B, генотип A/G полиморфизма rs1130864 гена CRP, генотип A/G полиморфизма rs13290979 гена NOTCH1

Таблица 3. Характеристики изученных генных полиморфизмов

Table 3. Characteristics of the studied gene polymorphisms

Полиморфизм Single nucleotide polymorphism	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Хромосомная позиция Chromosomal position	Аминокислотная замена Amino acid substitution	5'-3'(F)- и 3'-5'(R)-праймеры для полимеразной цепной реакции Forward 5'-3' and reverse 3'-5' polymerase chain reaction primers
Ген IL1B/IL1B gene				
rs1143634	G > A	113590390	Phe105Phe	F: cataagcctcggtatccccatgtgtc R: aagaagataggttctgaaatgtgga
Ген IL6/IL6 gene				
rs1554606	T > G	22768707	интронный intronic	F: ttagtcatcctgggaaaggctactc R: cagggcctttccctctctggtctgc
rs1800796	G > C	22766246	5'-upstream	F: atggccaggcagttctacaacagcc R: ctacagggagagccagaacacaga
rs2069827	G > T	22765456	5'-upstream	F: gcccaacagaggctactgtttatc R: atctgaagatctctcttagca
Ген IL6R/IL6R gene				
rs2228145	A > T/C	154426970	Asp358Val/Ala	F: aatTTTTTTTaaacctagtgcagg R: ttcttctcagtagcactgccaca
rs2229238	T > C	154437896	3'-HTP 3'-UTR	F: ccagcagcctggaccctgtggatga R: aaaacacaacgggctcagcaaaag
Ген IL8/IL8 gene				
rs2227306	C > T	74607055	интронный intronic	F: aactctaacttttatataggaagt R: gttcaatgtgtcagttatgactgt
Ген IL10/IL10 gene				
rs1800871	A > G	206946634	5'-upstream	F: agtgagcaaaactgaggcacagagat R: ttacatcacctgtacaagggtacac
rs1800872	T > G	206946407	5'-upstream	F: ttttactttccagagactggcttctacag R: acaggggggtcacaggatgttccaggc
rs1800896	T > C	206946897	5'-upstream	F: tcctcttacctatccctacttcccc R: tcccaagaagccttagtagtgtg
Ген IL12B/IL12B gene				
rs3212227	T > G	158742950	3'-HTP 3'-UTR	F: attgttcaatgagcatttagcatc R: aactatacaatacagcaaagatat
Ген IL12RB/IL12RB gene				
rs375947	A > G	18180451	Met365Thr	F: aggctgccattcaatgcaatacgtc R: tgctctgagcccggtggtgccaata
Ген TNF/TNF gene				
rs361525	G > A	31543101	5'-upstream	F: ggcccagaagacccccctcggaatc R: gagcagggaggatggggagtgtgag
rs1800629	G > A	31543031	5'-upstream	F: gaggcaataggtttgaggggcatg R: ggacggggttcagcctccagggtcc
Ген CRP/CRP gene				
rs3093077	A > C	159679636	неизвестна not announced	F: ggaatccaggcaagtacgacaacc R: tctgagactagtggtcagttgtcct
rs1130864	G > A	159683091	3'-HTP 3'-UTR	F: cctcaaatctgattctttggacc R: ttccagcatagtaacgagctcc
rs1205	C > T	159682233	3'-HTP 3'-UTR	F: acttccagttggctctgtctctca R: agtctctcctatgtggcaacaag
Ген APOB/APOB gene				
rs1042031	C > T	21225753	Glu4181Lys	F: caatcagatgctgactttcatatggaatt R: ttgagtaactcgtaccaagccatcaaacac
rs6725189	G > T	21219001	неизвестна not announced	F: ttcccagcctcagctcaacagagctatggg R: cagcagctggcctctctattgtcttcc

Окончание таблицы 3

Table 3 ending

Полиморфизм Single nucleotide polymorphism	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Хромосомная позиция Chromosomal position	Аминокислотная замена Amino acid substitution	5'-3'(F)- и 3'-5'(R)-праймеры для полимеразной цепной реакции Forward 5'-3' and reverse 3'-5' polymerase chain reaction primers
Ген APOE/APOE gene				
rs7412	C > T	45412079	Arg176Cys	F: ctctccgcgatgccgatgacctgcagaag R: gcctggcagtgaccaggccggggcccgcg
rs429358	T > C	45411941	Cys130Arg	F: gcccgctggcgcgacatggaggacgtg R: gcggccgctggtgcagtaccgcggcgagg
Ген LIPC/LIPC gene				
rs1800588	C > T	58723675	5'-upstream	F: tcttctctctcgtcagctcctttgaca R: gggggtgaagggtttctgcaccacacttt
Ген LPA/LPA gene				
rs10455872	A > G	161010118	интронный intronic	F: tcagacacctgttctcagaacca R: tgtgtttatacaggttagaggagaa
Ген NOTCH1/NOTCH1 gene				
rs13290979	A > G	139425634	интронный intronic	F: ccagcccagcagtgagaactgagcccac R: accctctggcctgacctactcgggctt
Ген VDR/VDR gene				
rs2228570	A > G	48272895	Met1Thr/Lys/Arg	F: ggcaggaagtgtggtggccgattgctcc R: tcctgtagaacagcaagcaggccacggt
Ген CASR/CASR gene				
rs1042636	A > G	122003769	Arg990Gly	F: gatgagcctcagaagaacgcatggcccac R: ggaattctacgcaccagaactccctggagg
Ген OPG/OPG gene				
rs3134069	A > C	119964988	5'-upstream	F: ggagctcctacgcgctgaactctggagt R: gcctcctcagggtcttccactagcctcaa
rs2073618	G > C	119964052	Asn3Lys	F: gggacttaccacgagcgcgacacagcaa R: ttgtcattggtgtcccggaaacactcagg
rs3102735	T > C	119965070	5'-upstream	F: ctttgccttagggtcgtctcctccat R: aattccctggtctagaagttagacttgatg
Ген CALCR/CALCR gene				
rs1801197	A > G	93055753	Leu481Pro	F: tcgccttggtgtggtggttcttctc R: gctcctgatggcagatgtaattgggatgt
Ген F2/F2 gene				
rs1799963	G > A	46761055	3'-HTP 3'-UTR	F: gttcccaataaagtgactctcagc R: agcctcaatgctcccagtgctattc
Ген F5/F5 gene				
rs6025	T > C	169519049	Gln534Arg	F: ttactcaaggacaaaatctgtattcct R: gcctgtccaggatctgcttctacagatta
rs6027	T > C	169483561	Asp222Gly	F: gggttttgaatgtcaattctagtaaata R: cacagccaagagtccaggcgaagtgcaa
Ген F7/F7 gene				
rs6046	G > A	113773159	Arg412Gln/Pro/Leu	F: acagtggaggccacatgccaccactacc R: gggcacgtgtacctgacgggcatcgtcag
Ген ITGB3/ITGB3 gene				
rs5918	T > C	45360730	Leu59Pro	F: ttgggctcctgacttacaggccctgcctc R: gggctcacctcgtgtgacctgaaggagaa

Примечания. HTP — нетранслируемый регион, IL — интерлейкин, TNF — фактор некроза опухоли, CRP — C-реактивный белок, APO — аполипопротеин, LIPC — печеночная липаза, LPA — липопротеин (a), VDR — рецептор витамина D, CASR — кальций-чувствительный рецептор, OPG — остеопротегерин, CALCR — кальцитониновый рецептор, ITGB — интегрин бета.

Notes. UTR — untranslated region, IL — interleukin, TNF — tumor necrosis factor, CRP — C-reactive protein, APO — apolipoprotein, LIPC — hepatic lipase, LPA — lipoprotein (a), VDR — vitamin D receptor, CASR — calcium-sensing receptor, OPG — osteoprotegerin, CALCR — calcitonin receptor, ITGB — integrin beta.

Таблица 4. Связь полиморфизмов генов цитокинового и острофазового ответа, гемостаза, липидного и кальциевого метаболизма с инфекционным эндокардитом (только значимые ассоциации)

Table 4. Association of the polymorphisms within the cytokine immunity genes, acute phase response genes, hemostasis genes, genes of lipid metabolism, and genes of calcium metabolism with infective endocarditis (only significant associations)

Модель наследования Model of inheritance	Генотип Genotype	Безинфекционного эндокардита Without infective endocarditis	С инфекционным эндокардитом With infective endocarditis	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	P	ИКА AIC	РХВ HWE
IL1B rs1143634							
Кодоминантная Codominant	G/G	154 (51,3%)	82 (67,8%)	1,00	0,0029	472,5	0,89
	G/A	123 (41%)	28 (23,1%)	0,43 (0,26–0,72)			
	A/A	23 (7,7%)	11 (9,1%)	0,97 (0,43–2,18)			
Доминантная Dominant	G/G	154 (51,3%)	82 (67,8%)	1,00	0,0036	473,8	
	G/A-A/A	146 (48,7%)	39 (32,2%)	0,51 (0,32–0,81)			
Рецессивная Recessive	G/G-G/A	277 (92,3%)	110 (90,9%)	1,00	0,52	481,8	
	A/A	23 (7,7%)	11 (9,1%)	1,30 (0,59–2,88)			
Сверхдоминантная Overdominant	G/G-A/A	177 (59%)	93 (76,9%)	1,00	0,0016	470,6	
	G/A	123 (41%)	28 (23,1%)	0,43 (0,26–0,71)			
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	0,70 (0,48–1,00)	0,046	478,2	
IL12B rs3212227							
Кодоминантная Codominant	T/T	191 (63,7%)	86 (70,5%)	1,00	0,076	480,2	0,86
	G/T	96 (32%)	29 (23,8%)	0,57 (0,34–0,96)			
	G/G	13 (4,3%)	7 (5,7%)	1,20 (0,45–3,24)			
Доминантная Dominant	T/T	191 (63,7%)	86 (70,5%)	1,00	0,067	480	
	G/T-G/G	109 (36,3%)	36 (29,5%)	0,64 (0,40–1,04)			
Рецессивная Recessive	T/T-G/T	287 (95,7%)	115 (94,3%)	1,00	0,5	482,9	
	G/G	13 (4,3%)	7 (5,7%)	1,41 (0,53–3,75)			
Сверхдоминантная Overdominant	T/T-G/G	204 (68%)	93 (76,2%)	1,00	0,025	478,3	
	G/T	96 (32%)	29 (23,8%)	0,57 (0,34–0,94)			
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	0,78 (0,53–1,16)	0,21	481,8	
CRP rs1130864							
Кодоминантная Codominant	G/G	142 (47,3%)	68 (55,7%)	1,00	0,018	477,9	0,41
	A/G	134 (44,7%)	38 (31,1%)	0,58 (0,36–0,93)			
	A/A	24 (8%)	16 (13,1%)	1,45 (0,70–3,00)			
Доминантная Dominant	G/G	142 (47,3%)	68 (55,7%)	1,00	0,12	481,4	
	A/G-A/A	158 (52,7%)	54 (44,3%)	0,71 (0,45–1,09)			
Рецессивная Recessive	G/G-A/G	276 (92%)	106 (86,9%)	1,00	0,094	481,1	
	A/A	24 (8%)	16 (13,1%)	1,83 (0,91–3,69)			
Сверхдоминантная Overdominant	G/G-A/A	166 (55,3%)	84 (68,8%)	1,00	0,0083	476,9	
	A/G	134 (44,7%)	38 (31,1%)	0,54 (0,34–0,86)			
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	0,93 (0,67–1,30)	0,68	483,7	
CRP rs1205							
Кодоминантная Codominant	C/C	112 (37,3%)	38 (31,9%)	1,00	0,018	468,4	0,11
	C/T	154 (51,3%)	56 (47,1%)	1,06 (0,64–1,74)			
	T/T	34 (11,3%)	25 (21%)	2,50 (1,28–4,90)			
Доминантная Dominant	C/C	112 (37,3%)	38 (31,9%)	1,00	0,28	473,3	
	C/T-T/T	188 (62,7%)	81 (68,1%)	1,29 (0,81–2,07)			
Рецессивная Recessive	C/C-C/T	266 (88,7%)	94 (79%)	1,00	0,0047	466,5	
	T/T	34 (11,3%)	25 (21%)	2,42 (1,32–4,43)			
Сверхдоминантная Overdominant	C/C-T/T	146 (48,7%)	63 (52,9%)	1,00	0,34	473,6	
	C/T	154 (51,3%)	56 (47,1%)	0,80 (0,52–1,25)			
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	1,47 (1,05–2,05)	0,023	469,3	

Окончание таблицы 4

Table 4 ending

Модель наследования Model of inheritance	Генотип Genotype	Без инфекционного эндокардита Without infective endocarditis	С инфекционным эндокардитом With infective endocarditis	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	P	ИКА AIC	PXB HWE
CALCR rs1801197							
Кодоминантная Codominant	A/A	140 (46,8%)	76 (62,8%)	1,00	0,0077	474	0,22
	A/G	136 (45,5%)	40 (33,1%)	0,52 (0,33–0,84)			
	G/G	23 (7,7%)	5 (4,1%)	0,36 (0,13–1,03)			
Доминантная Dominant	A/A	140 (46,8%)	76 (62,8%)	1,00	0,0024	472,5	
	A/G-G/G	159 (53,2%)	45 (37,2%)	0,50 (0,32–0,79)			
Рецессивная Recessive	A/A-A/G	276 (92,3%)	116 (95,9%)	1,00	0,13	479,5	
	G/G	23 (7,7%)	5 (4,1%)	0,48 (0,17–1,33)			
Сверхдоминантная Overdominant	A/A-G/G	163 (54,5%)	81 (66,9%)	1,00	0,018	476,2	
	A/G	136 (45,5%)	40 (33,1%)	0,58 (0,36–0,92)			
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	0,56 (0,38–0,82)	0,002	472,2	

Примечания. Все ОШ и 95% ДИ приведены с поправками на пол и возраст. IL — интерлейкин, CRP — С-реактивный белок, CALCR — кальцитониновый рецептор, ОШ — отношение шансов, ДИ — доверительный интервал, ИКА — информационный критерий Акаике, PXB — равновесие Харди-Вайнберга.

Notes. All the ORs and 95% CIs are adjusted for age and gender. IL — interleukin, CRP — C-reactive protein, CASR — calcium-sensing receptor, OR — odds ratio, CI — confidence interval, AIC — Akaike information criterion, HWE — Hardy-Weinberg equilibrium.

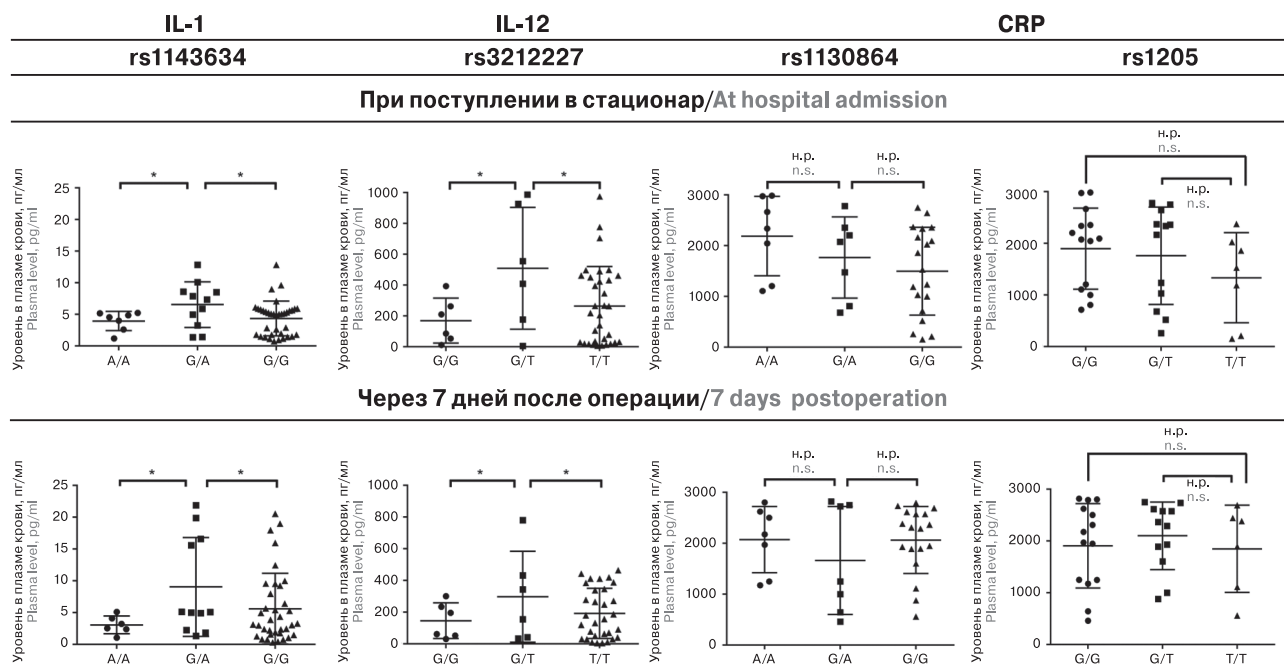


Рисунок. Измерения уровня IL-1 β , IL-12 и С-реактивного белка (CRP) в плазме крови пациентов с инфекционным эндокардитом при поступлении в стационар и через 7 дней после операции

Figure. Measurement of plasma IL-1 β , IL-12, and C-reactive protein (CRP) levels in patients with infective endocarditis at the hospital admission and 7 days postoperation

Примечания. Двусторонний t-критерий Стьюдента с последующим критерием Тьюки с целью поправки на множественные сравнения; каждая точка на графике представляет собой измерение с одного пациента, * $p < 0,05$; н.р. — нет статистически значимых различий.

Notes. Two-tailed Student's t-test with the further Tukey's post hoc test to adjust for multiple comparisons; each dot is a measure from one patient, * $p < 0,05$; n.s. is for not significant.

и аллель G полиморфизма rs1801197 гена CALCR связаны со сниженным риском развития ИЭ, в то время как генотип T/T полиморфизма rs1205 гена CRP ассоциирован с повышенной вероятностью возникновения ИЭ.

Последние работы Weinstock с соавт. [36] и Giannitsioti с соавт. [14] выявили, что полиморфизмы генов IL1B, IL6 и TNF могут быть связаны с ИЭ, однако нам не удалось подтвердить данные результаты касательно генов IL6 и TNF. Это может быть объяснено малыми размерами выборок и различиями между выборками (к примеру, пол, возраст, этническая принадлежность и клинические особенности), а также географическими различиями в микробной этиологии ИЭ [12, 17]. Поскольку все изученные нами полиморфизмы были в равновесии Харди–Вайнберга, маловероятно, что имели место ошибки генотипирования.

Генотип G/A полиморфизма rs1143634 гена IL1B и генотип G/T полиморфизма rs3212227 гена IL12B были ассоциированы с повышенным уровнем IL-1 β и IL-12 в плазме крови, что может указывать на механизм их протективной роли. Известно, что содержание обоих данных цитокинов в сыворотке пациентов с ИЭ выше, чем у больных с другими инфекциями [1]; это может быть обусловлено специфичностью иммунного ответа на бактериальную или грибную инфекцию клапанов или камер сердца. Можно предположить, что IL-1 β и IL-12 могут препятствовать инфицированию и прогрессированию ИЭ. Ранее было показано, что уровень C-реактивного белка в плазме крови у пациентов с ИЭ также выше в сравнении с другими субъектами [35], однако связей полиморфизмов гена CRP с уровнем данного белка в плазме крови нами найдено не было.

Проведенное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, размер выборки достаточно

небольшой вследствие сравнительно низкой частоты ИЭ, однако это является общим недостатком всех генетико-эпидемиологических работ по ИЭ. При нашем размере выборки (124 пациента и 300 субъектов контрольной группы), вероятность обнаружить различия с ОШ = 2 и ОШ = 3 (мощность исследования) составила 83 и 99,7% соответственно, при стандартной 5% вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу. К сожалению, тем не менее, невозможной была оценка генетических ассоциаций с особенностями или тяжестью ИЭ. Во-вторых, из-за технических сложностей не удалось собрать информацию о потенциальных факторах образа жизни, таких как злоупотребление алкоголем, курение и т.д. В-третьих, не удалось оценить микробиологический профиль пациентов с ИЭ вследствие активной антибиотикотерапии в учреждениях здравоохранения по месту жительства. Наконец, в данное исследование были включены лишь пациенты, которым требовалось хирургическое вмешательство, поскольку другие пациенты с ИЭ не поступают в клинику НИИ КПССЗ.

Таким образом, наследственные различия в генах цитокинового и острофазового ответа, а также генах метаболизма кальция могут быть связаны с ИЭ, что указывает на соответствующие особенности патогенеза этого заболевания. Гетерозиготные генотипы полиморфизмов rs1143634 и rs3212227 ассоциированы как со сниженным риском развития ИЭ, так и с повышенным уровнем IL-1 β и IL-12 в плазме крови соответственно, что позволяет предположить важность данных молекул для развития ИЭ. Для подтверждения наших результатов и дальнейшего изучения генетических основ восприимчивости к ИЭ необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Список литературы/References

1. Araújo I.R., Ferrari T.C., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Guimarães Júnior M.H., Barros T.L., Gelape C.L., Sousa G.R., Nunes M.C. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 7, e0133631. doi: 10.1371/journal.pone.0133631
2. Bakhtiar S.M., Ali A., Baig S.M., Barh D., Miyoshi A., Azevedo V. Identifying human disease genes: advances in molecular genetics and computational approaches. *Genet. Mol. Res.*, 2014, vol. 13, iss. 3, pp. 5073–5087. doi: 10.4238/2014.July.4.23
3. Bin Abdulhak A.A., Baddour L.M., Erwin P.J., Hoen B., Chu V.H., Mensah G.A., Tleyjeh I.M. Global and regional burden of infective endocarditis, 1990–2010: a systematic review of the literature. *Glob. Heart*, 2014, vol. 9, iss. 1, pp. 131–143. doi: 10.1016/j.jgheart.2014.01.002
4. Bustamante J., Tamayo E., Flórez S., Telleria J.J., Bustamante E., López J., San Román J.A., Alvarez F.J. Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2011, vol. 64, iss. 11, pp. 1056–1059. doi: 10.1016/j.rec.2011.02.027
5. Buyukasýk N.S., Ileri M., Alper A., Senen K., Atak R., Hisar I., Yetkin E., Turhan H., Demirkan D. Increased blood coagulation and platelet activation in patients with infective endocarditis and embolic events. *Clin. Cardiol.*, 2004, vol. 27, iss. 3, pp. 154–158. doi: 10.1002/clc.4960270312
6. Cahill T.J., Prendergast B.D. Infective endocarditis. *Lancet*, 2016, vol. 387, iss. 10021, pp. 882–893. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00067-7
7. Chu V.H., Cabell C.H., Benjamin D.K. Jr., Kuniholm E.F., Fowler V.G. Jr., Engemann J., Sexton D.J., Corey G.R., Wang A. Early predictors of in-hospital death in infective endocarditis. *Circulation*, 2004, vol. 109, iss. 14, pp. 1745–1749. doi: 10.1161/01.CIR.0000124719.618277F
8. Daga S., Shepherd J.G., Callaghan J.G., Hung R.K., Dawson D.K., Padfield G.J., Hey S.Y., Cartwright R.A., Newby D.E., Fitzgerald J.R. Platelet receptor polymorphisms do not influence Staphylococcus aureus-platelet interactions or infective endocarditis. *Microbes Infect.*, 2011, vol. 13, iss. 3, pp. 216–225. doi: 10.1016/j.micinf.2010.10.016

9. Daga S., Shepherd J.G., Hung R.K., Callaghan J.G., Dawson D.K., Padfield G.J., Fitzgerald J.R., Newby D.E. GPIb VNTR C/C genotype may predict embolic events in infective endocarditis. *J. Heart Valve Dis.*, 2013, vol. 22, iss. 1, pp. 133–141.
10. Dayem Ullah A.Z., Lemoine N.R., Chelala C. SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants (2012 update). *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40 (Web Server issue), pp. W65–70. doi: 10.1093/nar/gks364
11. Durante-Mangoni E., Iossa D., Molaro R., Andini R., Mattucci I., Malgeri U., Albisinni R., Utili R. Prevalence and significance of two major inherited thrombophilias in infective endocarditis. *Intern. Emerg. Med.*, 2015, vol. 10, iss. 5, pp. 587–594. doi: 10.1007/s11739-015-1214-8
12. Elbey M.A., Akdağ S., Kalkan M.E., Kaya M.G., Sayın M.R., Karapınar H., Bulur S., Ulus T., Akıl M.A., Elbey H.K., Akyüz A. A multicenter study on experience of 13 tertiary hospitals in Turkey in patients with infective endocarditis. *Anadolu Kardiyol. Derg.*, 2013, vol. 13, iss. 6, pp. 523–527. doi: 10.5152/akd.2013.172
13. Elkhatib W.F., Hair P.S., Nyalwidhe J.O., Cunnion K.M. New potential role of serum apolipoprotein E mediated by its binding to clumping factor A during *Staphylococcus aureus* invasive infections to humans. *J. Med. Microbiol.* 2015, vol. 64 (pt. 4), pp. 335–343. doi: 10.1099/jmm.0.000010
14. Giannitsioti E., Damoraki G., Rokkas C., Tsaganos T., Fragou A., Kannelaki S., Athanasia S., Giamarellos-Bourboulis E.J. Impact of haplotypes of TNF in the natural course of infective endocarditis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, iss. 5, pp. 459–464. doi: 10.1111/1469-0691.12370
15. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Salakhov R.R., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene*, 2014, vol. 550, iss. 1, pp. 101–109. doi: 10.1016/j.gene.2014.08.022
16. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Yuzhalin A.E., Salakhov R.R., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Savostyanova Y.Y., Barbarash L.S. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine*, 2015, vol. 71, iss. 1, pp. 16–21. doi: 10.1016/j.cyto.2014.08.001
17. Gupta K., Jagadeesan N., Agrawal N., Bhat P., Nanjappa M.C. Clinical, echocardiographic and microbiological study, and analysis of outcomes of infective endocarditis in tropical countries: a prospective analysis from India. *J. Heart Valve Dis.*, 2014, vol. 23, iss. 5, pp. 624–632.
18. Habib G., Hoen B., Tornos P., Thuny F., Prendergast B., Vilacosta I., Moreillon P., De Jesus Antunes M., Thilen U., Lekakis J., Lengyel M., Müller L., Naber C.K., Nihoyannopoulos P., Moritz A., Zamorano J.L., ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.*, 2009, vol. 30, iss. 19, pp. 2369–2413. doi: 10.1093/eurheartj/ehp285
19. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongioni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F., Dulgheru R., El Khoury G., Erba P.A., Jung B., Miro J.M., Mulder B.J., Plonska-Gosciniak E., Price S., Roos-Hesselink J., Snygg-Martin U., Thuny F., Tornos Mas P., Vilacosta I., Zamorano J.L. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.*, 2015, vol. 36, iss. 44, pp. 3075–3128. doi: 10.1093/eurheartj/ehv319
20. Hill E.E., Herijgers P., Claus P., Vanderschueren S., Herregods M.C., Peetermans W.E. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *Eur. Heart J.*, 2007, vol. 28, iss. 2, pp. 196–203. doi: 10.1093/eurheartj/ehl427
21. İleri M., Kanat S., Orhan G., Bayır P.T., Gürsoy H.T., Şahin D., Çiçek G., Elalmış Ö.U., Güray Ü. Increased mean platelet volume in patients with infective endocarditis and embolic events. *Cardiol. J.*, 2015, vol. 22, iss. 1, pp. 37–43. doi: 10.5603/CJ.a2014.0021
22. Kahveci G., Bayrak F., Mutlu B., Gurel Y.E., Karaahmet T., Tigen K., Basaran Y. Clinical significance of high-density lipoprotein cholesterol in left-sided infective endocarditis. *Am. J. Cardiol.*, 2008, vol. 101, iss. 8, pp. 1170–1173. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.11.075
23. Kutikhin A.G., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Salakhov R.R., Golovkin A.S., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene*, 2016, vol. 9, pp. 76–89. doi: 10.1016/j.mgene.2016.04.001
24. Mangoni E., Molaro R., Iossa D. The role of hemostasis in infective endocarditis. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2014, vol. 16, iss. 11: 435. doi: 10.1007/s11908-014-0435-8
25. McNicholas S., Talento A.F., O’Gorman J., Hannan M.M., Lynch M., Greene C.M., Humphreys H., Fitzgerald-Hughes D. Cytokine responses to *Staphylococcus aureus* bloodstream infection differ between patient cohorts that have different clinical courses of infection. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14: 580. doi: 10.1186/s12879-014-0580-6
26. Muñoz P., Kestler M., De Alarcon A., Miro J.M., Bermejo J., Rodríguez-Abella H., Fariñas M.C., Cobo Belaustegui M., Mestres C., Llinares P., Goenaga M., Navas E., Oteo J.A., Tarabini P., Bouza E., Spanish Collaboration on Endocarditis-Grupo de Apoyo al Manejo de la Endocarditis Infecciosa en España (GAMES). Current epidemiology and outcome of infective endocarditis: a multicenter, prospective, cohort study. *Medicine (Baltimore)*, 2015, vol. 94, iss. 43, e1816. doi: 10.1097/MD.0000000000001816
27. Murdoch D.R., Corey G.R., Hoen B., Miró J.M., Fowler V.G. Jr., Bayer A.S., Karchmer A.W., Olaison L., Pappas P.A., Moreillon P., Chambers S.T., Chu V.H., Falcó V., Holland D.J., Jones P., Klein J.L., Raymond N.J., Read K.M., Tripodi M.F., Utili R., Wang A., Woods C.W., Cabell C.H., International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study (ICE-PCS) Investigators. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the international collaboration on endocarditis-prospective cohort study. *Arch. Intern. Med.*, 2009, vol. 169, iss. 5, pp. 463–473. doi: 10.1001/archinternmed.2008.603
28. Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Tsepokina A.V., Kondyukova N.V., Yuzhalin A.E., Barbarash L.S. A genomics-based model for prediction of severe bioprosthetic mitral valve calcification. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, iss. 9, p. E1385. doi: 10.3390/ijms17091385
29. San Román J.A., López J., Vilacosta I., Luaces M., Sarriá C., Revilla A., Ronderos R., Stoermann W., Gómez I., Fernández-Avilés F. Prognostic stratification of patients with left-sided endocarditis determined at admission. *Am. J. Med.*, 2007, vol. 120, iss. 4, e1–7. doi: 10.1186/1471-2334-10-17

30. Snipsøyr M.G., Ludvigsen M., Petersen E., Wiggers H., Honoré B. A systematic review of biomarkers in the diagnosis of infective endocarditis. *Int. J. Cardiol.*, 2016, vol. 202, pp. 564–570. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.09.028
31. Solé X., Guinó E., Valls J., Iñiesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, iss. 15, pp. 1928–1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268
32. Thuny F., Textoris J., Amara A.B., Filali A.E., Capo C., Habib G., Raoult D., Mege J.L. The gene expression analysis of blood reveals S100A11 and AQP9 as potential biomarkers of infective endocarditis. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 2, e31490. doi: 10.1371/journal.pone.0031490
33. Vollmer T., Kleesiek K., Dreier J. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) gene polymorphisms: rapid genotyping by real-time PCR and association with infective endocarditis. *Clin. Biochem.*, 2009, vol. 42, iss. 13–14, pp. 1413–1419. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.010
34. Wang A., Athan E., Pappas P.A., Fowler V.G. Jr., Olaison L., Paré C., Almirante B., Muñoz P., Rizzi M., Naber C., Logar M., Tattevin P., Iarussi D.L., Selton-Suty C., Jones S.B., Casabé J., Morris A., Corey G.R., Cabell C.H., International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Investigators. Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis. *JAMA*, 2007, vol. 297, iss. 12, pp. 1354–1361. doi: 10.1001/jama.297.12.1354
35. Watkin R.W., Harper L.V., Vernallis A.B., Lang S., Lambert P.A., Ranasinghe A.M., Elliott T.S. Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-alpha, IL1beta, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis. *J. Infect.*, 2007, vol. 55, iss. 3, pp. 220–225. doi: 10.1016/j.jinf.2007.05.174
36. Weinstock M., Grimm I., Dreier J., Knabbe C., Vollmer T. Genetic variants in genes of the inflammatory response in association with infective endocarditis. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 10, e110151. doi: 10.1371/journal.pone.0110151
37. Xu Z., Taylor J.A. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37 (Web Server issue), pp. W600–605. doi: 10.1093/nar/gkp290
38. Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. Integrative systems of genomic risk markers for cancer and other diseases: future of predictive medicine. *Cancer Manag. Res.*, 2012, vol. 4, pp. 131–135. doi: 10.2147/CMAR.S30855

Авторы:

Понасенко А.В., к.м.н., зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Кутихин А.Г., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Хуторная М.В., младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Рутковская Н.В., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кардиоваскулярного биопротезирования отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Кондюкова Н.В., младший научный сотрудник лаборатории кардиоваскулярного биопротезирования отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Одаренко Ю.Н., д.м.н., зав. лабораторией кардиоваскулярного биопротезирования отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Казачек Я.В., к.м.н., ученый секретарь ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Цепочкина А.В., младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Южалин А.Е., аспирант Оксфордского института радиационной онкологии, Оксфорд, Великобритания;

Барбараш Л.С., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

Барбараш О.Л., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия.

Authors:

Ponosenko A.V., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Kutikhin A.G., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Khutornaya M.V., Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Rutkovskaya N.V., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Bioprosthetic Heart Valves, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Kondyukova N.V., Junior Researcher, Laboratory of Cardiovascular Prostheses, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Odarenko Yu.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Cardiovascular Prostheses, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Kazachek Ya.V., PhD (Medicine), Scientific Secretary, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Tsepokina A.V., Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Yuzhalin A.E., PhD Student, Oxford Institute for Radiation Oncology, Oxford, Great Britain;

Barbarash L.S., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

Barbarash O.L., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.02.2017
Отправлена на доработку 13.03.2017
Принята к печати 17.04.2017

Received 27.02.2017
Revision received 13.03.2017
Accepted 17.04.2017

ВКЛАД РЕЦЕПТОРОВ CD95 И DR3 В АПОПТОЗ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ В ПЕРИОД РЕКОНВАЛЕСЦЕНЦИИ

Е.Н. Филатова¹, Е.В. Анисенкова¹, Н.Б. Преснякова¹, Е.А. Кулова², О.В. Уткин^{1,2}

¹ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Инфекционный мононуклеоз — широко распространенное заболевание, вызываемое некоторыми представителями семейства *Herpesviridae*. Острая форма инфекционного мононуклеоза развивается преимущественно у детей и на уровне иммунного ответа сопровождается увеличением в периферической крови числа циркулирующих наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Нормализация иммунологических показателей достигается в течение 4–6 месяцев после выздоровления, что служит индикаторным показателем адекватного функционирования иммунной системы. «Рецепторы смерти» CD95 и DR3 участвуют в инициации апоптоза наивных Т-лимфоцитов, как в норме, так и при остром инфекционном мононуклеозе. Целью работы явилась оценка способности рецепторов CD95 и DR3 инициировать апоптоз наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с инфекционным мононуклеозом в период реконвалесценции. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови детей, ранее перенесших инфекционный мононуклеоз. Забор крови проводили повторно спустя 4–6 месяцев после заболевания. На момент проведения исследования у детей не выявлялись клинические и лабораторные признаки инфекционного мононуклеоза. В качестве группы сравнения выступали дети, которые обследовались нами ранее в период развития у них острого инфекционного мононуклеоза, а также условно здоровые дети. Выделение наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов проводили методом негативной магнитной иммуносепарации. Для специфической стимуляции рецепторов CD95 и DR3 использовали моноклональные антитела. Уровень апоптоза и экспрессию «рецепторов смерти» оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Анализировали свежееизолированные клетки, а также клетки, культивируемые с добавлением соответствующих моноклональных антител. Показано, что период выздоровления сопровождался усилением апоптоза свежееизолированных наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с острой фазой инфекционного мононуклеоза. При этом в обеих популяциях наивных Т-лимфоцитов наблюдалось повышение восприимчивости CD95⁺ клеток к апоптозу. В культуре клеток стимуляция CD95 не приводила к изменению уровня апоптоза наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. В свежееизолированных наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах DR3⁺ клетки были резистентными к апоптозу, а в процессе культивирования их чувствительность изменялась в зависимости от субпопуляционной принадлежности. Так, в культуре наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов DR3 не участвовал в передаче проапоптотического сигнала. В культуре наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов DR3⁺ клетки усиливали апоптоз клеток, не экспрессирующих этот рецептор. При этом активация DR3 моноклональными антителами в культуре вызывала гибель DR3⁺ наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов,

Адрес для переписки:

Филатова Елена Николаевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
Нижегородский НИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniem.ru

Contacts:

Elena N. Filatova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya Yamskaya str., 71,
Blokina Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniem.ru

Библиографическое описание:

Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Кулова Е.А., Уткин О.В.
Вклад рецепторов CD95 и DR3 в апоптоз наивных Т-лимфоцитов
у детей с инфекционным мононуклеозом в период реконвалесценции //
Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 141–150.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-141-150

Citation:

Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Kulova E.A., Utkin O.V.
Role of CD95 and DR3 receptors in naive T-lymphocytes apoptosis in children
with infectious mononucleosis during convalescence // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2,
pp. 141–150. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-141-150

© Филатова Е.Н. и соавт., 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-141-150>

что закономерно сопровождалось снижением проапоптотической активности этих клеток и приводило к ингибированию апоптоза суммарного пула наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Таким образом, функциональная способность рецепторов CD95 и DR3 участвовать в инициации апоптоза наивных Т-лимфоцитов у детей в период реконвалесценции инфекционного мононуклеоза различается и зависит от их принадлежности к наивным CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам.

Ключевые слова: CD95, DR3, апоптоз, наивные Т-лимфоциты, CD4, CD8, инфекционный мононуклеоз.

ROLE OF CD95 AND DR3 RECEPTORS IN NAÏVE T-LYMPHOCYTES APOPTOSIS IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS DURING CONVALESCENCE

Filatova E.N.^a, Anisenkova E.V.^a, Presnyakova N.B.^a, Kulova E.A.^b, Utkin O.V.^{a,b}

^a Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Infectious mononucleosis is a widespread disease caused by certain members of *Herpesviridae* family. Acute infectious mononucleosis develops predominantly in children and is accompanied by an increase of the number of circulating naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes in the peripheral blood. The normalization of immunological parameters is achieved within 4–6 months after recovery and that is an indicator of a proper functioning of the immune system. CD95 and DR3 death receptors are involved in the initiation of apoptosis of naive T-lymphocytes in healthy people and in patients with infectious mononucleosis. The aim of the study was to evaluate the ability of CD95 and DR3 receptors to initiate apoptosis of naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes in children with infectious mononucleosis during convalescence. The material for the study was the samples of the peripheral blood of children who previously had infectious mononucleosis. The blood sampling was carried out again after 4–6 months after the disease. At the time of the study, children did not display clinical and laboratory signs of infectious mononucleosis. Same children who were examined earlier in the period of the development of acute infectious mononucleosis, as well as relatively healthy children were used as the comparison groups. Isolation of naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes was performed by negative magnetic immunoseparation. For specific stimulation of CD95 and DR3 receptors monoclonal antibodies were used. The level of apoptosis and expression of death receptors were evaluated by flow cytometry. Freshly isolated cells were analyzed, as well as cells cultured with the addition of appropriate monoclonal antibodies. It was shown that the recovery period was accompanied by increased apoptosis of freshly isolated naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes compared with the acute phase of infectious mononucleosis. Thus in both populations of naive T-cells showed an increase of CD95⁺ cells' susceptibility to apoptosis. CD95 stimulation in the cell culture did not lead to the change in the level of apoptosis of naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes. The freshly isolated naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes DR3⁺ cells were resistant to apoptosis, and in the process of cultivating their sensitivity varied depending on the subpopulation belonging. Thus in the culture of naive CD4⁺ T-lymphocytes DR3 was not involved in the transfer of pro-apoptotic signal. In the culture of naive CD8⁺ T-lymphocytes DR3⁺ cells were possible to increase the apoptosis of DR3-negative cells. At the same time the DR3 activation by monoclonal antibodies in the culture caused the death of DR3⁺ naive CD8⁺ T-lymphocytes that naturally associated with decreased proapoptotic activity of these cells and resulted in inhibition of apoptosis of total pool of naive CD8⁺ T-lymphocytes. Thus, the functional ability of CD95 and DR3 receptors to trigger an apoptosis of naive T-lymphocytes in children during convalescence of infectious mononucleosis varied and depended on their belonging to naive CD4⁺ or naive CD8⁺ T-lymphocytes.

Key words: CD95, DR3, apoptosis, naive T-lymphocytes, CD4, CD8, infectious mononucleosis.

Введение

В настоящее время в педиатрической практике проблема инфекционного мононуклеоза (ИМ) является одной из наиболее актуальных. Инфекционный мононуклеоз — полиэтиологичное заболевание, чаще всего вызываемое вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловирусом (ЦМВ) и герпесвирусом человека 6 типа (ВГЧ 6). Данными возбудителями инфицировано более 90% мирового населения, однако симптомы острого заболевания развиваются редко, чаще всего у детей и подростков [6].

Иммунный ответ при остром ИМ характеризуется увеличением числа специфических противовирусных CD4⁺ и, в большей степени, CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови [7, 10, 11]. Абсолютное содержание наивных Т-клеток, являющихся предшественниками эффекторных Т-лимфоцитов, также возрастает в течение острой стадии заболевания [1, 12, 14]. Снижение абсолютного количества наивных CD4⁺ (нТх) и CD8⁺ (нЦТЛ) Т-лимфоцитов в этот период является неблагоприятным признаком и свидетельствует о хронизации инфекции [13, 15]. Содержание наивных Т-лимфоцитов в кро-

ви зависит от уровня апоптоза покоящихся и делящихся клеток [9]. На молекулярном уровне инициация клеточной гибели Т-лимфоцитов реализуется с участием так называемых «рецепторов смерти» [3].

В период реконвалесценции ИМ наблюдается нормализация иммунологических показателей в течение 4–6 месяцев. Однако у части детей, перенесших острый ИМ, отклонения показателей клеточного звена иммунитета продолжают выявляться спустя полгода и более, что связывают с формированием вторичного иммунодефицита. Выявление признаков нарушения работы иммунной системы в эти сроки, в том числе на молекулярном уровне, требует проведения активных мероприятий, направленных на подавление инфекционного процесса и восстановление иммунологических функций [1].

Ранее нами показано, что у детей в норме и при остром течении ИМ члены белкового семейства «рецепторов смерти» CD95 (Fas, Apo-1) и DR3 (LARD, Apo-3) играют неоднозначную роль в инициации апоптоза иммунокомпетентных клеток, в том числе наивных Т-лимфоцитов [2, 4]. При остром ИМ наблюдали снижение уровня апоптоза нЦТЛ после активации рецепторов CD95 и DR3. Уровень апоптоза нТх при заболевании не изменялся [5, 8]. Функциональная направленность рецепторов CD95 и DR3 в отношении наивных Т-лимфоцитов детей с ИМ в период реконвалесценции не известна.

Целью данного исследования явилась апоптоз-ассоциированная оценка последствий активации рецепторов CD95 и DR3 для наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с ИМ в период реконвалесценции.

Материалы и методы

Данная работа явилась заключительным этапом в изучении вклада рецепторов CD95 и DR3 в апоптоз наивных Т-лимфоцитов у детей при ИМ. В исследовании приняли участие дети в возрасте от 9 до 16 лет, ранее переболевшие острым ИМ. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови. Забор крови проводили повторно спустя 4–6 месяцев после заболевания по согласованию с родителями или опекунами, а также с разрешения этического комитета. На момент забора материала у детей не выявлялись клинические и лабораторные признаки ИМ. В качестве группы сравнения выступали те же дети, которые обследовались нами ранее в период развития острого ИМ, а также условно здоровые дети сопоставимого пола и возраста (результаты опубликованы в предыдущих работах) [5, 8].

Ход работы полностью соответствовал описанному ранее. Популяции нТх и нЦТЛ вы-

деляли методом негативной магнитной иммуносепарации с применением коммерческих наборов серии EasySep («Stemcell Technologies», Великобритания) согласно инструкции производителя. Чистоту выделения наивных Т-клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии с применением панели флуоресцентно меченых антител. Чистота выделения наивных Т-лимфоцитов составила более 98%. Изолированные нТх и нЦТЛ культивировали отдельно в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Австрия) и 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37°C и 5% CO₂. Специфическую активацию клеток проводили мышиными моноклональными антителами (МКА) против CD95 человека (изотип IgM, клон СН-11, «Beckman Coulter», США) либо против DR3 человека (клон JD3, изотип IgG1 kappa, «eBioscience», США) в концентрации 200 нг/мл. Контрольные наивные Т-клетки инкубировали с добавлением фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4).

Оценку уровня апоптоза и экспрессии рецепторов CD95 и DR3 проводили методом проточной цитофлуориметрии. Использовали проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II («Becton, Dickinson and Company», США). Настройки напряжения на фотоумножителях и настройки компенсации флуоресценции оптимизировали с помощью коммерческих наборов «Cytometry set up and tracking beads» и «Antimouse Ig, k/negative control compensation particles set» («BD Biosciences», США). Уровень фонового свечения для флуоресцентно меченых антител определяли с применением соответствующих изотипических контролей. Сбор данных проводили в программе FACSDiva («BD Biosciences», США). В каждом образце анализировали 30 000 клеток. Анализировали клетки в четырех вариантах: свежеизолированные, культивируемые контрольные, культивируемые с добавлением анти-CD95 МКА и культивируемые с добавлением анти-DR3 МКА.

Уровень апоптоза наивных Т-лимфоцитов определяли с применением флуоресцентно меченых антител Annexin V-FITC (AV) («eBioscience», США) и 7-аминоактиномицином-D (7AAD) («BD Pharmigen», США). В зависимости от двойного окрашивания лимфоциты различали как живые (AV⁻7AAD⁻), в ранней стадии апоптоза (AV⁺7AAD⁻) и в поздней стадии апоптоза (AV⁺7AAD⁺). Определяли процент живых клеток, клеток в ранней и поздней стадии апоптоза от общего числа клеток в гейте лимфоцитов. В дальнейшем гейты живых и ранне-апоптотических Т-лимфоцитов анализировали отдельно.

В каждом гейте определяли поверхностную экспрессию CD95 и DR3. Применяли флуоресцентно окрашенные антитела CD95-PE-Cy7 и DR3-PE («eBioscience», США). Подсчитывали процент живых и находящихся в ранней стадии апоптоза CD95⁻, CD95⁺, DR3⁻ и DR3⁺ клеток от общего количества клеток в гейте лимфоцитов. Плотность экспрессии молекул на поверхности наивных Т-лимфоцитов оценивали исходя из средней интенсивности флуоресценции несущих рецепторы клеток (MFI).

Статистический анализ проводили с применением парного и непарного t-критерия Стьюдента либо парного и непарного критерия Уилкоксона. Для оценки влияния условий культивирования Т-лимфоцитов на исследуемые параметры использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями либо критерий Фридмана, а также модель логистической регрессии со смешанными эффектами. Значения «р» при множественных сравнениях корректировали с помощью поправки Холма–Бонферрони. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. В тексте результаты представляли с указанием 95%-ного доверительного интервала (ДИ) разницы средних в абсолютных значениях.

Результаты

Оценка уровня апоптоза и экспрессии рецепторов CD95 и DR3 в свежеизолированных нТх детей с ИМ в период реконвалесценции

Выздоровление после ИМ сопровождалось снижением количества живых нТх и увеличением числа клеток в ранней стадии апоптоза по сравнению с острым периодом заболевания. Количество живых нТх снижалось в 1,27 раза (ДИ = 3,76–26,47%, $p = 0,016$), а содержание клеток в ранней стадии апоптоза увеличивалось в 2,08 раза (ДИ = 6,65–23,82%, $p = 0,004$). Процент нТх в поздней стадии апоптоза не изменялся (рис. 1А).

При сравнении реконвалесцентом и условно здоровых детей различий в процентах живых и апоптотирующих свежеизолированных нТх выявлено не было (рис. 2А).

В период реконвалесценции процент свежеизолированных живых CD95⁺ нТх снижался в 1,31 раза (ДИ = 1,88–17,57%, $p = 0,022$) по сравнению с острым периодом заболевания. Процент живых CD95⁻ клеток, а также плотность экспрессии данного рецептора на мембране нТх не изменялись. На стадии выздоровления наблюдалось снижение процента живых DR3⁻ нТх в 1,50 раза (ДИ = 10,68–34,43%, $p = 0,003$) и возрастание процента живых DR3⁺ клеток в 3,56 раза (ДИ = 4,58–10,30, $p < 0,001$). Также выявлено повышение плотности экспрессии DR3 в 2,11 раза (ДИ = 17,50–47,76, $p = 0,002$) на поверхности живых нТх у детей после пере-

несенного заболевания по сравнению с острой фазой ИМ (рис. 1Б–Г).

При сравнении свежеизолированных живых нТх условно здоровых детей и детей в период реконвалесценции различий в экспрессии CD95 и DR3 обнаружено не было (рис. 2Б–Г).

По сравнению с острым периодом ИМ при реконвалесценции процент раннеапоптотических CD95⁻ нТх возрастал в 2,35 раза (ДИ = 2,68–11,24%, $p = 0,006$), а процент CD95⁺ клеток — в 1,93 раза (ДИ = 3,40–13,15%, $p = 0,005$). При этом процент раннеапоптотических DR3⁻ нТх увеличивался в 1,85 раза (ДИ = 3,54–17,66%, $p = 0,009$), а процент DR3⁺ клеток в 3,90 раза (ДИ = 2,68–6,59%, $p < 0,001$). Плотность экспрессии «рецепторов смерти» на мембране раннеапоптотических нТх при реконвалесценции, наоборот, снижалась в 1,99 раза (ДИ = 29,18–1207,18, $p = 0,023$) и в 10,11 раза (ДИ = 92,02–1571,47, $p = 0,033$) (для рецепторов CD95 и DR3 соответственно) (рис. 1Б–Г).

При сравнении свежеизолированных нТх детей после выздоровления с условно здоровыми детьми выявлено возрастание процента раннеапоптотических DR3⁻ клеток у реконвалесцентом в 1,81 раза (ДИ = 1,81–18,72%, $p = 0,021$). Других отличий в экспрессии CD95 и DR3 не обнаружено (рис. 2Б–Г).

Оценка уровня апоптоза и экспрессии рецепторов CD95 и DR3 в свежеизолированных нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции

Как и в нТх, в свежеизолированных нЦТЛ детей в период выздоровления выявлены изменения уровня апоптоза клеток по сравнению с острым периодом ИМ. Реконвалесценция сопровождалась снижением процента живых нЦТЛ в 1,42 раза (ДИ = 5,98–31,89%, $p = 0,011$) и возрастанием процента клеток в ранней стадии апоптоза в 2,01 раза (ДИ = 8,79–24,46%, $p = 0,002$). Процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза не изменялся (рис. 1А).

В свежеизолированных нЦТЛ детей после выздоровления выявлено возрастание процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза в 1,45 раза (ДИ = 1,54–20,19%, $p = 0,025$) по сравнению с условно здоровыми детьми. Других различий в содержании нЦТЛ не обнаружено (рис. 2А).

В период реконвалесценции по сравнению с острым периодом ИМ изменения экспрессии CD95 и DR3 в живых нЦТЛ были аналогичны нТх. Реконвалесценция сопровождалась снижением процента свежеизолированных живых CD95⁺ нЦТЛ в 1,56 раза (ДИ = 5,07–22,49%, $p = 0,007$), тогда как процент живых CD95⁻ клеток и плотность экспрессии данного рецептора не изменялись. Процент живых DR3⁻ нЦТЛ при выздоровлении снижался в 1,72 раза (ДИ = 12,25–35,59%, $p = 0,003$), а процент живых DR3⁺

клеток возрастал в 3,04 раза (ДИ = 3,65–9,32%, $p = 0,001$). Также выявлено увеличение плотности экспрессии DR3 в 2,25 раза (ДИ = 21,44–50,01, $p < 0,001$) на мембране живых нЦТЛ у реконвалесцентов (рис. 1Б-Г).

У детей после выздоровления выявлено увеличение плотности экспрессии CD95 в 1,05 раза

(ДИ = 68,34–93,83, $p < 0,001$) и снижение плотности экспрессии DR3 в 1,54 раза (ДИ = 17,92–70,61, $p < 0,001$) на поверхности живых нЦТЛ по сравнению с условно здоровыми детьми. В данных группах сравнения других различий в экспрессии «рецепторов смерти» не обнаружено (рис. 2Б-Г).

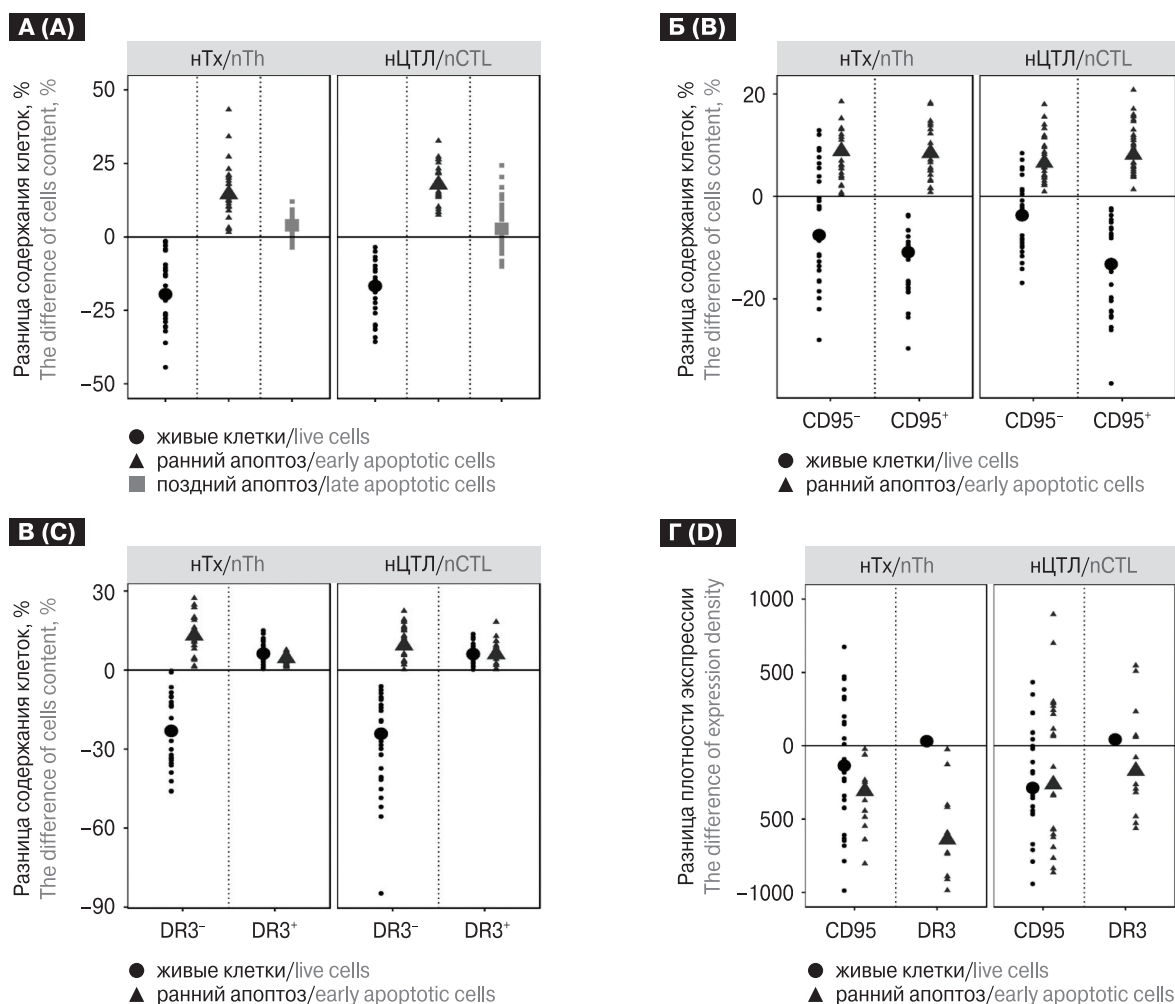


Рисунок 1. Разница содержания живых и апоптотических клеток, а также экспрессии рецепторов CD95 и DR3 среди нТх и нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции по сравнению с периодом острого заболевания

Figure 1. The difference between the content of live and apoptotic cells and the expression of CD95 and DR3 receptors among nTh and nCTL in children with infectious mononucleosis (IM) during convalescence compared with the period of acute illness

Примечания. На рисунке приведены разности параметров детей в период реконвалесценции и в период острого ИМ. Крупным знаком обозначены медианы выборок. А) Разница процента живых наивных Т-лимфоцитов, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. Б) Разница процента CD95⁻ и CD95⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. В) Разница процента DR3⁻ и DR3⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. Г) Разница плотности экспрессии CD95 на поверхности CD95⁺ наивных Т-лимфоцитов и DR3 на поверхности DR3⁺ наивных Т-лимфоцитов. Для наглядности указаны значения в интервале [-1000; +1000].

Notes. The figure shows the difference between the parameters in children during convalescence and acute IM. The large sign marks the sample median. A) The difference between the percentages of live naive T-lymphocytes, cells in the early and late stages of apoptosis. B) The difference between the percentage of CD95⁻ and CD95⁺ cells in live and apoptotic naive T-lymphocytes. C) The difference between the percentages of DR3⁻ and DR3⁺ cells in live and apoptotic naive T-lymphocytes. D) The difference between densities of the CD95 expression on the surface of CD95⁺ naive T-lymphocytes and DR3 expression on the surface of DR3⁺ naive T-lymphocytes. For clarity the values listed in the range [-1000; +1000].

По сравнению с периодом острого ИМ при реконвалесценции процент раннеапоптотических CD95⁻ нЦТЛ увеличивался в 2,46 раза (ДИ = 4,10–12,09%, $p = 0,002$), а процент раннеапоптотических CD95⁺ клеток в 1,79 раза (ДИ = 4,36–12,70%, $p = 0,002$). Процентное содержание DR3⁻ и DR3⁺ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза при выздоровлении также возрастало в 1,71 и 4,29 раза (ДИ = 5,05–15,42%, $p = 0,002$ и ДИ = 2,98–9,80%, $p = 0,003$) соответственно. Плотность экспрессии CD95 на мембране нЦТЛ в ранней стадии апоптоза, наоборот, снижалась в 1,98 раза (ДИ = 52,12–1155,98, $p = 0,023$) на фоне отсутствия изменений плотности экспрессии DR3 (рис. 1Б–Г).

По сравнению с условно здоровыми детьми у реконвалесцентов наблюдалось повышение процента свежеизолированных раннеапоптотических CD95⁻ и CD95⁺ нЦТЛ в 1,44 и 1,46 раза (ДИ = 0,27–9,87%, $p = 0,046$ и ДИ = 1,11–11,59%, $p = 0,021$) соответственно. Процент раннеапоптотических DR3⁻ нЦТЛ возрастал в 1,58 раза (ДИ = 2,31–16,98%, $p = 0,013$), а процент раннеапоптотических DR3⁺ клеток, а также плотность экспрессии CD95 и DR3 не изменялись (рис. 2Б–Г).

Влияние активации рецепторов CD95 и DR3 на апоптоз нТх детей с ИМ в период реконвалесценции

У детей в период реконвалесценции культивирование контрольных нТх приводило к снижению процента живых и раннеапоптотических клеток в 1,22 и в 1,50 раза (ДИ = 3,00–24,32%, $p = 0,008$ и 2,98–18,17%, $p = 0,003$) соответственно, по сравнению со свежеизолированными клетками. Процент нТх в поздней стадии апоптоза, наоборот, возрастал в 3,31 раза (ДИ = 7,45–31,29%, $p < 0,001$). Схожие результаты были получены при специфической активации рецепторов CD95 и DR3. При добавлении анти-CD95 МКА процент живых и раннеапоптотических нТх снижался в 1,24 раза и в 1,64 раза (ДИ = 3,22–28,63%, $p = 0,10$ и ДИ = 5,14–20,46%, $p < 0,001$), соответственно, а процент нТх в поздней стадии апоптоза возрастал в 3,50 раза (ДИ = 8,28–39,52%, $p = 0,001$). Добавление анти-DR3 МКА приводило к снижению процентного содержания живых и раннеапоптотических нТх в 1,23 раза и в 1,34 раза (ДИ = 2,82–24,15%, $p = 0,008$ и ДИ = 1,06–16,26%, $p = 0,015$) соответственно. Процент нТх в поздней стадии апоптоза при этом возрастал в 2,87 раза (ДИ = 4,99–28,83%, $p = 0,002$) (рис. 2А).

При активации CD95 различий в экспрессии данного рецептора живыми и апоптотирующими нТх обнаружено не было. Как в культивируемом контроле, так и при добавлении анти-CD95 МКА наблюдалось уменьшение

процента живых CD95⁺ клеток. В контроле процент живых CD95⁺ нТх снижался в 1,26 раза (ДИ = 2,95–18,00%, $p = 0,003$), а при активации CD95 в 1,31 раза (ДИ = 1,23–16,28%, $p = 0,013$). Процент живых CD95⁻ нТх в обоих случаях не изменялся. Обнаружено снижение плотности экспрессии CD95 на мембране живых нТх при культивировании по сравнению со свежеизолированными клетками. В контроле плотность экспрессии снижалась в 1,28 раза (ДИ = 27,05–152,08, $p = 0,002$), а при активации CD95 в 1,21 раза (ДИ = 6,25–131,56, $p = 0,019$). Как в контроле, так и при специфической активации CD95 процент CD95⁻ и CD95⁺ нТх в ранней стадии апоптоза не изменялся. При этом в обоих случаях культивирование приводило к снижению плотности экспрессии рецептора на мембране раннеапоптотических клеток: в контроле — в 1,30 раза (ДИ = 34,65–179,08, $p = 0,002$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,25 раза (ДИ = 6,75–151,18, $p = 0,021$) (рис. 2Б, Г).

Как в контроле, так и при активации DR3 в пуле живых нТх снижался процент DR3⁻ и DR3⁺ клеток, а плотность экспрессии DR3 не изменялась по сравнению со свежеизолированными нТх. В контроле процент живых DR3⁻ клеток снижался в 1,19 раза (ДИ = 0,85–19,67%, $p = 0,026$), а процент живых DR3⁺ нТх — в 1,42 раза (ДИ = 1,70–5,12%, $p < 0,001$). При добавлении анти-DR3 МКА процент живых DR3⁻ и DR3⁺ нТх также снижались в 1,19 раза (ДИ = 1,13–19,96%, $p = 0,026$) и в 1,32 раза (ДИ = 1,24–4,65%, $p < 0,001$). В пуле раннеапоптотических нТх независимо от стимуляции DR3 культивирование сопровождалось снижением процента DR3⁻ клеток на фоне отсутствия различий процента DR3⁺ нТх. Процент раннеапоптотических DR3⁻ нТх снижался в контроле в 1,45 раза (ДИ = 0,09–13,02%, $p = 0,042$), а при добавлении анти-DR3 МКА в 1,29 раза (ДИ = 1,57–14,68%, $p = 0,011$). Также в обоих случаях культивирование приводило к снижению плотности экспрессии DR3 на мембране нТх в ранней стадии апоптоза. В контроле плотность экспрессии рецептора снижалась в 1,23 раза (ДИ = 6,55–31,88, $p = 0,001$), а при добавлении анти-DR3 МКА в 1,33 раза (ДИ = 2,41–27,74, $p = 0,012$) (рис. 2В, Г).

Влияние активации рецепторов CD95 и DR3 на апоптоз нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции

При культивировании нЦТЛ детей в период выздоровления после острого ИМ нами выявлено снижение процента живых и раннеапоптотических нЦТЛ и возрастание процента клеток в поздней стадии апоптоза в контроле и при активации CD95. В контроле процент живых и раннеапоптотических нЦТЛ снижался в 1,22 и 1,83 раза (ДИ = 0,56–16,25%, $p = 0,023$ и ДИ =

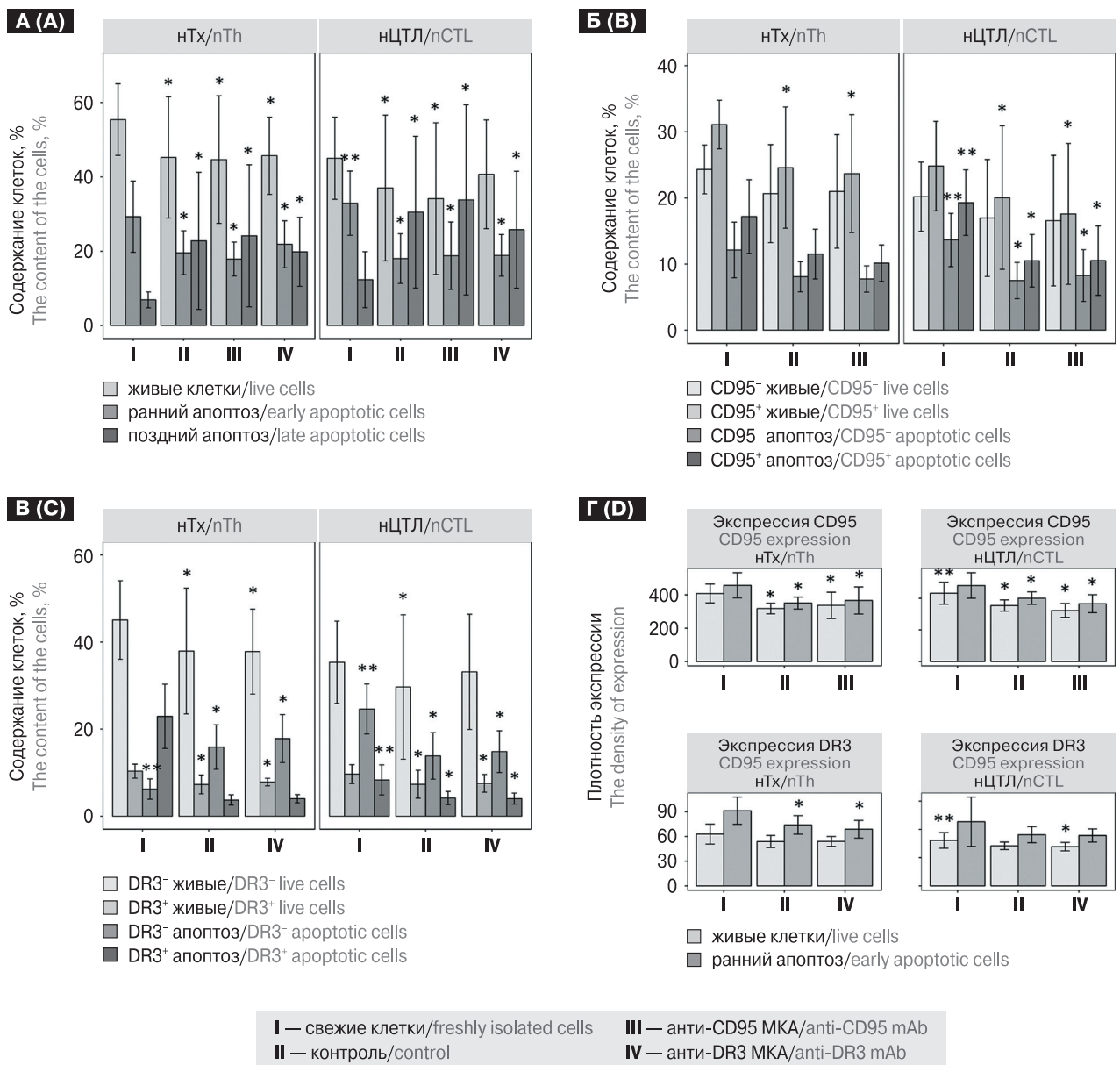


Рисунок 2. Содержание живых и апоптотических клеток, а также экспрессия рецепторов CD95 и DR3 среди нТх и нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции

Figure 2. Percentage of live and apoptotic cells and also the expression of CD95 and DR3 receptors among naive T-helpers (nTh) and naive cytotoxic T-lymphocytes (nCTL) in children with infectious mononucleosis (IM) during convalescence

Примечания. * — статистически значимые различия при сравнении со свежеизолированными клетками ($p < 0,05$); ** — статистически значимые различия при сравнении со свежеизолированными нТх и нЦТЛ условно здоровых детей ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее значение показателя и стандартное отклонение. А) Процент живых наивных Т-лимфоцитов, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. Б) Процент CD95⁻ и CD95⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. В) Процент DR3⁻ и DR3⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. Г) Плотность экспрессии CD95 на поверхности CD95⁺ наивных Т-лимфоцитов и плотность экспрессии DR3 на поверхности DR3⁺ наивных Т-лимфоцитов.

Notes. * — statistically significant differences compared with freshly isolated cells ($p < 0,05$); ** — statistically significant differences compared with freshly nTh and nCTL of relatively healthy children ($p < 0,05$). Data are presented as the mean and standard deviation. A) The percentage of live naive T-lymphocyte, cells in the early and the late stages of apoptosis. B) The percentage of CD95⁻ and CD95⁺ cells in live and apoptotic naive T- lymphocytes. C) The percentage of DR3⁻ and DR3⁺ cells in live and apoptotic naive T-lymphocytes. D) The density of CD95 expression on the surface of CD95⁺ naive T-cells and DR3 expression on the surface of DR3⁺ naive T-lymphocytes.

8,07–22,91%, $p < 0,001$) соответственно, по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами. Процент клеток в поздней стадии апоптоза возрастал в 2,47 раза (ДИ = 9,36–28,22%, $p < 0,001$). Культивирование нЦТЛ с добавлением анти-CD95 МКА приводило к снижению процента живых и раннеапоптотических клеток в 1,32 и 1,75 раза (ДИ = 3,38–19,04%, $p = 0,002$ и ДИ = 6,29–23,38%, $p < 0,001$) соответственно. Процент клеток в поздней стадии апоптоза при активации CD95 увеличивался в 2,74 раза (ДИ = 10,42–33,69%, $p < 0,001$). При специфической активации DR3 культивирование нЦТЛ не сопровождалось изменением процента живых клеток. Однако процент раннеапоптотических нЦТЛ снижался в 1,75 раза (ДИ = 7,31–22,16%, $p < 0,001$). При этом процент клеток в поздней стадии апоптоза возрастал в 2,09 раза (ДИ = 4,79–23,65%, $p < 0,001$) (рис. 2А).

Как в культивируемом контроле, так и при добавлении анти-CD95 МКА в пуле живых клеток снижался процент только CD95⁺ нЦТЛ. В контроле процент живых CD95⁺ нЦТЛ снижался в 1,24 раза (ДИ = 3,04–11,87%, $p = 0,017$), а при активации CD95 в 1,41 раза (ДИ = 0,55–9,37%, $p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами. Процент живых CD95⁻ клеток в обоих случаях не изменялся. Культивирование сопровождалось снижением плотности экспрессии CD95 на мембране живых нЦТЛ. В контроле плотность экспрессии данного рецептора снижалась в 1,22 раза (ДИ = 21,64–115,62, $p = 0,001$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,32 раза (ДИ = 53,44–147,42, $p < 0,001$). При культивировании нЦТЛ процент CD95⁻ и CD95⁺ клеток в ранней стадии апоптоза снижался по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами вне зависимости от активации CD95. В контроле процент раннеапоптотических CD95⁻ нЦТЛ снижался в 1,82 раза (ДИ = 2,68–10,25%, $p < 0,001$), а процент раннеапоптотических CD95⁺ клеток — в 1,84 раза (ДИ = 4,27–13,79%, $p < 0,001$). При добавлении анти-CD95 МКА процент CD95⁻ клеток в ранней стадии апоптоза понижался в 1,65 раза (ДИ = 1,94–9,51%, $p < 0,001$), а процент раннеапоптотических CD95⁺ нЦТЛ — в 1,83 раза (ДИ = 4,36–13,88%, $p < 0,001$). Как в контроле, так и при активации CD95 плотность экспрессии рецептора на мембране раннеапоптотических нЦТЛ уменьшалась. В контроле плотность экспрессии снижалась в 1,20 раза (ДИ = 7,25–124,86, $p = 0,017$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,32 раза (ДИ = 41,76–159,38, $p < 0,001$) (рис. 2Б, Г).

Стимуляция рецептора DR3 при культивировании нЦТЛ сопровождалась изменением его экспрессии в живых клетках. В контроле наблюдалось снижение процента живых DR3⁻ нЦТЛ в 1,19 раза (ДИ = 0,97–13,00%, $p = 0,043$)

и DR3⁺ клеток в 1,31 раза (ДИ = 1,95–3,28%, $p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами. Культивирование с добавлением анти-DR3 МКА сопровождалось снижением только процента живых DR3⁺ клеток в 1,28 раза (ДИ = 0,74–3,62%, $p < 0,001$). Плотность экспрессии рецептора DR3 на мембране живых клеток при культивировании снижалась только при его активации в 1,16 раза (ДИ = 0,30–16,51, $p = 0,045$). В контроле различий обнаружено не было. В пуле раннеапоптотических нЦТЛ выявлено снижение процента DR3⁻ и DR3⁺ клеток вне зависимости от условий культивирования. В контроле процент раннеапоптотических DR3⁻ нЦТЛ снижался в 1,78 раза (ДИ = 5,75–17,02%, $p < 0,001$), а при добавлении анти-DR3 МКА — в 1,66 раза (ДИ = 4,86–16,13%, $p < 0,001$). Процент DR3⁺ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза в контроле снижался в 2,00 раза (ДИ = 1,73–6,48%, $p < 0,001$), а при активации рецептора — в 2,07 раза (ДИ = 1,86–6,62%, $p < 0,001$). Плотность экспрессии DR3 на мембране раннеапоптотических нЦТЛ не изменялась вне зависимости от добавления анти-DR3 МКА (рис. 2В, Г).

Обсуждение

Нами показано, что в период реконвалесценции у детей с острым ИМ наблюдалось изменение восприимчивости наивных Т-лимфоцитов к апоптозу, в инициации которого неоднозначную роль играли рецепторы CD95 и DR3. Их функциональная направленность зависела от популяционной принадлежности наивных Т-клеток (нТх или нЦТЛ).

В период выздоровления при изолированном культивировании нТх апоптозу подвергались преимущественно CD95⁺ клетки. При этом стимуляция клеток анти-CD95 МКА не оказывала влияние на уровень апоптоза суммарного пула нТх. Ранее нами показано, что CD95 проявляет аналогичные свойства в нТх детей с острым ИМ. У практически здоровых доноров, наоборот, изолированные CD95⁺ нТх человека не обладают повышенной чувствительностью к апоптозу, в том числе, CD95-индуцированному [5]. Мы полагаем, что на стадии выздоровления, как и в острый период ИМ, CD95 является корцепторной молекулой, повышающей восприимчивость экспрессирующих его нТх к апоптозу.

Как и в нТх, в культуре нЦТЛ в период реконвалесценции CD95⁺ нЦТЛ проявляли высокую чувствительность к апоптозу, однако его уровень также не изменялся при активации рецептора CD95. Сходная картина наблюдалась ранее при исследовании условно здоровых детей. Наоборот, в период острого ИМ CD95⁺ нЦТЛ проявляли резистентность к апоптозу, а стимуляция

анти-CD95 МКА вызывала его ингибирование в составе суммарной фракции нЦТЛ [5]. Таким образом, в период реконвалесценции ИМ антиапоптотический потенциал рецептора CD95 снижался на фоне частичного усиления его цитотоксической направленности, что рассматривается нами как элемент «нормализации» функциональных свойств рецептора.

При реконвалесценции DR3⁺ нТх в культуре были восприимчивы к апоптозу. Стимуляция рецептора DR3 не оказывала влияния на уровень апоптоза суммарной фракции наивных CD4⁺ Т-клеток. Вместе с тем, ранее показано, что у практически здоровых детей и в острый период ИМ DR3⁺ нТх проявляли резистентность к апоптозу и подавляли его развитие в DR3⁻ клетках при специфической активации рецептора [8]. Таким образом, в период выздоровления резко падает антиапоптотическая роль рецептора DR3 в составе нТх.

В культуре нЦТЛ, полученных у детей в период реконвалесценции ИМ, выявлена способность DR3⁺ клеток усиливать апоптоз наивных Т-клеток, не экспрессирующих данный рецептор. Сами DR3⁺ нЦТЛ к апоптозу были резистентны. Однако добавление анти-DR3 МКА вызывало гибель DR3⁺ клеток, что сопровождалось снижением их потенциально проапоптогенных свойств в отношении других субпопуляций нЦТЛ и закономерным ингибированием апоптоза суммарной фракции наивных Т-лимфоцитов. Предыдущие исследования показали, что аналогичные свойства рецептора DR3 проявляются в культуре нЦТЛ, полученных у детей в период острого ИМ. У практически здоровых детей в культуре DR3⁺ нЦТЛ, наоборот, проявляли чувствительность к апоптозу, а специфическая активация рецептора DR3 приводила к усилению их проапоптогенных свойств [8]. Следовательно, как в острый период ИМ, так и на стадии реконвалесценции функциональная роль рецептора DR3 сходна.

Нами обнаружено, что по сравнению с острым периодом заболевания у реконвалесцентов

свежеизолированные нТх и нЦТЛ отличались более выраженной чувствительностью к апоптозу. Изменялось относительное содержание этих популяций наивных Т-лимфоцитов, фенотипически различающихся по экспрессии рецепторов CD95 и DR3. Повышение восприимчивости клеток к апоптозу сопровождалось снижением относительного содержания CD95⁺ и увеличением числа DR3⁺ наивных Т-клеток. При этом как нТх, так и в нЦТЛ возрастала плотность экспрессии одного из «рецепторов смерти» — DR3. Таким образом, у детей в период выздоровления повышение уровня апоптоза наивных Т-лимфоцитов было обусловлено возрастанием чувствительности CD95⁺ Т-клеток к апоптозу. В то же время, DR3-экспрессирующие клетки проявляли выраженную резистентность к индукции клеточной смерти.

Усиление апоптоза наивных Т-клеток в период реконвалесценции ИМ, по-видимому, является одним из механизмов снижения количества циркулирующих наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, возрастающего в острой стадии заболевания. У детей в период выздоровления степень выраженности апоптоза свежеизолированных нТх достигала значений, присущих условно здоровым детям. В свежеизолированных нЦТЛ детей в период реконвалесценции уровень апоптоза, наоборот, превышал значения данного показателя в группе сравнения. В ходе исследования нами показано, что у детей в период выздоровления после ИМ рецепторы CD95 и DR3 могут участвовать в регуляции апоптоза наивных Т-лимфоцитов. Их роль различается в зависимости от фенотипической принадлежности клеток.

Усиление восприимчивости наивных Т-клеток к апоптозу, в том числе при специфической активации рецепторов CD95 и DR3, можно рассматривать как дополнительный иммунологический показатель, свидетельствующий о нормализации функционирования Т-клеточного звена иммунитета после перенесенного заболевания.

Список литературы/References

1. Кудин А.П., Романовская Т.Р., Белевцев М.В. Состояние специфического иммунитета при инфекционном мононуклеозе у детей // Медицинский журнал. 2007. № 1 (19). С. 102–106. [Kudin A.P., Romanovskaya T.R., Belevtsev M.V. Condition of the specific immunity in infectious mononucleosis in children. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal*, 2007, no. 1 (19), pp. 102–106. (In Russ.)]
2. Уткин О.В., Бабаев А.А., Филатова Е.Н., Янченко О.С., Старикова В.Д., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Новиков В.В. Оценка сыровоточного уровня растворимого DR3/LARD при заболеваниях разного генеза // Иммунология. 2013. Т. 34, № 3. С. 148–151. [Utkin O.V., Babaev A.A., Filatova E.N., Yanchenko O.S., Starikova V.D., Evsegneeveva I.V., Karaulov A.V., Novikov V.V. Evaluation of serum levels of soluble DR3/LARD in diseases of different genesis. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 3, pp. 148–151. (In Russ.)]
3. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 4. С. 381–390. [Utkin O.V., Novikov V.V. Death receptors in modulation of apoptosis. *Uspekhi sovremennoi biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2012, vol. 132, no. 4, pp. 381–390. (In Russ.)]

4. Уткин О.В., Свинцова Т.А., Кравченко Г.А., Шмелева О.А., Новиков Д.В., Бабаев А.А., Собчак Д.М., Караулов А.В., Новиков В.В. Экспрессия альтернативных форм гена CD95/Fas в клетках крови при герпесвирусной инфекции // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 189–193. [Utkin O.V., Svintsova T.A., Kravchenko G.A., Shmeleva O.A., Novikov D.V., Babayev A.A., Sobchak D.M., Karaulov A.V., Novikov V.V. Gene expression CD95/FAS in the cells of the blood in herpes-virus infection. *Immunologiya = Immunology*, 2012, vol. 33, no. 4, pp. 189–193. (In Russ.)]
5. Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д., Кулова Е.А., Уткин О.В. Антиапоптотическое действие рецептора CD95 в наивных CD8⁺ Т-лимфоцитах у детей с острым инфекционным мононуклеозом // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 3. С. 207–218. [Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Sycheva T.D., Kulova E.A., Utkin O.V. Anti-apoptotic effect of CD95 receptor in naive CD8⁺ T-lymphocytes in children with acute infectious mononucleosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 207–218. doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-207-218 (In Russ.)]
6. Шарипова Е.В., Бабаченко И.В. Герпес-вирусные инфекции и инфекционный мононуклеоз (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 2. С. 5–12. [Sharipova E.V., Babachenko I.V. Herpesvirus infection and infectious mononucleosis. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 5–12. doi: 10.22625/2072-6732-2013-5-2-5-12 (In Russ.)]
7. Balfour H.N., Dunmire S.K., Hogquist K.A. Infectious mononucleosis. *Clin. Transl. Immunol.*, 2015, vol. 4, no. 2: e33. doi: 10.1038/cti.2015.1
8. Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Utkin O.V. DR3 regulation of apoptosis of naive T-lymphocytes in children with acute infectious mononucleosis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2016, vol. 63, no. 3, pp. 339–357. doi: 10.1556/030.63.2016.007
9. Narparachchi T., Lewis J., Callard R.E. A mechanistic model for naive CD4 T cell homeostasis in healthy adults and children. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 4: 366. doi:10.3389/fimmu.2013.00366
10. Hislop A.D., Taylor G.S., Sauce D., Rickinson A.B. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein–Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 25, pp. 587–617. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553
11. Janols H., Bredberg A., Thuveesson I., Janciauskiene S., Grip O., Wullt M. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. *BMC Infect. Dis.*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2334-10-205
12. Kimura M.Y., Pobeziysky L.A., Guintert T., Thomas J., Adams A., Park J.-H., Tai X., Singer, A. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8 T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 143–151. doi: 10.1038/ni.2494
13. Mao J.-Q., Yang S.-L., Song H., Zhao F.-Y., Xu X.-J., Gu M.-E., Tang Y.-M. Clinical and laboratory characteristics of chronic active Epstein–Barr virus infection in children. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2014, vol. 16, no. 11, pp. 1081–1085 (In Chin.).
14. Tussey L., Speller S., Gallimore A., Vessey R. Functionally distinct CD8⁺ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur. J. Immunol.*, 2000, vol. 30, no. 7, pp. 1823–1829.
15. Xing Y., Song H.M., Wei M., Liu Y., Zhang Y.H., Gao L. Clinical significance of variations in levels of Epstein–Barr virus (EBV) antigen and adaptive immune response during chronic active EBV infection in children. *J. Immunotoxicol.*, 2013, vol. 10, no. 4, pp. 387–392. doi: 10.3109/1547691X.2012.758199

Авторы:

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;
Анисенкова Е.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;
Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;
Кулова Е.А., к.м.н., ассистент кафедры детских инфекций ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия;
Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной; доцент кафедры микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Anisenkova E.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Presnyakova N.B., Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Kulova E.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Childhood Infections, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛЕЗА НА СТЕПЕНЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Е.В. Васильева¹, И.В. Кудрявцев^{2,5,6}, Г.В. Максимов³, В.Н. Вербов⁴,
М.К. Серебрякова², А.П. Ткачук¹, Арег А. Тотолян^{4,5}

¹ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва, Россия

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³СПбГУЗ Городской противотуберкулезный диспансер, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁵ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁶ФГАУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Туберкулез является ведущей причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией. В связи с этим актуальной задачей является своевременное выявление туберкулеза после установления диагноза ВИЧ-инфекции. Ранее мы показали, что диагностическая значимость *in vitro* теста QuantiFERON-TB Gold In-Tube не снижается у пациентов с туберкулезом на фоне ВИЧ-инфекции. Вместе с тем остается неясным, какие популяции клеток продуцируют IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию антигенами *Mycobacterium tuberculosis* в тестах *in vitro* у ВИЧ-инфицированных пациентов, поскольку иммунодефицит, вызванный ВИЧ, обусловлен в первую очередь уменьшением относительного содержания и ослаблением функций CD4 Т-лимфоцитов. Целью работы было сравнение степени дифференцировки Т-лимфоцитов CD4 (Th) и CD8 (Tcyt) у больных туберкулезом легких и здоровых доноров на фоне ВИЧ-инфекции. В исследовании получены данные при обследовании 28 пациентов с туберкулезом органов дыхания без ВИЧ-инфекции (ТБ+ВИЧ–), 23 пациентов с ВИЧ-инфекцией (ТБ–ВИЧ+) и 30 пациентов с коинфекцией ВИЧ и туберкулез (ТБ+ВИЧ+). Группу сравнения составили 37 здоровых лиц (ТБ–ВИЧ–). Оценка абсолютного и относительного содержания основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови (на основе экспрессии маркеров CD27, CD28, CD45RA и CD62L) была проведена методом проточной цитометрии всем лицам, включенным в исследование (n = 118). Пациентам с туберкулезом легких (n = 58) был выполнен тест QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Qiagen, QFT). Соотношение Th/Tcyt значимо не различалось в группах ТБ–ВИЧ– и ТБ+ВИЧ– (1,76 [1,51;2,30] против 1,86 [1,22;2,79], p = 0,960), в то время как для субпопуляции «терминально дифференцированных» Tcyt (Tcyt Eff, CD27–CD28–CD62L–CD45RA–) лимфоцитов и Th лимфоцитов эффекторной памяти (Th EM, CD27+CD28+CD62L–CD45RA–) были выявлены значимые различия при сравнении всех четырех исследуемых групп. Установлено разнонаправленное изменение абсолютного и относительного содержания этих популяций клеток, по сравнению со здоровыми донорами, по мере возникновения туберкулеза и ВИЧ-инфекции. Абсолютное содержание Tcyt Eff, по сравнению со здоровыми донорами (76,1 [20,7; 143,5]), увеличивается в 4 раза в группе ТБ+ВИЧ+

Адрес для переписки:

Васильева Елена Викторовна
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18,
ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.
Тел.: 8 921 931-10-21 (моб.).
E-mail: alenalenkina@gmail.com

Contacts:

Elena V. Vasileva
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 921 931-10-21 (mobile).
E-mail: alenalenkina@gmail.com

Библиографическое описание:

Васильева Е.В., Кудрявцев И.В., Максимов Г.В., Вербов В.Н.,
Серебрякова М.К., Ткачук А.П., Тотолян Арег А. Влияние ВИЧ-
инфекции и туберкулеза на степень дифференцировки Т-лимфоцитов
периферической крови // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2.
С. 151–161. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-151-161

Citation:

Vasileva E.V., Kudryavtsev I.V., Maximov G.V., Verbov V.N., Serebriakova M.K.,
Tkachuk A.P., Totolian Areg A. Impact of HIV infection and tuberculosis
on the peripheral blood T-cell differentiation // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 151–161.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-151-161

и в 2 раза в группах ТБ+ВИЧ– и ТБ-ВИЧ+. В то же время содержание Th EM увеличивается только к группе ТБ+ВИЧ–, по сравнению со здоровыми донорами. В группах пациентов с ВИЧ-инфекцией (ТБ–ВИЧ+ и ТБ+ВИЧ+) наблюдается снижение содержания этих клеток. Таким образом, в нашей работе показано, что популяции Th EM и Tcyt Eff могут потенциально рассматриваться как универсальные биомаркеры для двух социально значимых инфекционных заболеваний: туберкулеза и ВИЧ-инфекции. В следующих экспериментах необходимо провести валидацию полученных результатов и определить содержание Th EM и Tcyt Eff, специфичных к антигенам микобактерий.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, туберкулез, проточная цитометрия, субпопуляции T-хелперов, CD45RA, CD62L, QuantiFERON-TB Gold In-Tube.

IMPACT OF HIV INFECTION AND TUBERCULOSIS ON THE PERIPHERAL BLOOD T-CELL DIFFERENTIATION

Vasileva E.V.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,c,f}, Maximov G.V.^c, Verbov V.N.^d, Serebriakova M.K.^b, Tkachuk A.P.^a, Totolian Areg A.^{d,e}

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

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c City Anti-Tuberculosis Dispensary, St. Petersburg, Russian Federation

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

^e Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^f Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Tuberculosis is the leading cause of death among HIV infected individuals. In this regard, an important task is the timely detection of tuberculosis in HIV infected patients. Previously, we have shown that the diagnostic value of in vitro test, QuantiFERON-TB Gold In-Tube is not decreased in patients with HIV infection against the background of tuberculosis. However, it remains unclear what kind of cell populations produce IFN γ in response to specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens stimulation in vitro, because the immunodeficiency, caused by HIV, makes primarily for a decrease the abundance and attenuation functions of CD4 T-lymphocytes. The aim of this work was to compare the degree of differentiation of T-lymphocytes CD4 (Th) and CD8 (Tcyt) in patients with pulmonary tuberculosis and healthy donors against the background of HIV infection. The study data were obtained during the examination of 28 patients with pulmonary tuberculosis without HIV infection (HIV–TB+), 23 patients with HIV infection (TB–HIV+) and 30 patients coinfecting with HIV and tuberculosis (TB+HIV+). The comparison group consisted of 37 healthy individuals (TB–HIV–). Absolute and abundance (relative content) of major subpopulations of T-lymphocytes (based on the expression of CD27 marker, CD28, CD45RA and CD62L) in the peripheral blood for all patients included in the study (n = 118) were evaluated by flow cytometry approach. For patients with pulmonary tuberculosis (n = 58) QuantiFERON-TB Gold In Tube (Qiagen, QFT) test was performed. Th/Tcyt ratio was not significantly different among the groups of TB–HIV– and TB+HIV– (1.76 [1.51; 2.30] against 1.86 [1.22; 2.79], p = 0.960). At that time, the size of both subpopulations “terminally differentiated” Tcyt (Tcyt Eff, CD27–CD28–CD62L–CD45RA–) Th lymphocytes and effector memory lymphocytes (Th EM, CD27–CD28+CD62L–CD45RA–), was significantly different in all four study groups. Multidirectional changes of the absolute and abundance (relative content) in these cell populations in comparison with healthy donors for tuberculosis and HIV infection was noticed. Absolute content of Tcyt Eff, compared with healthy donors (76.1 [20.7; 143.5]), 4-fold increases in the group of HIV+TB+ and 2 times in groups TB+HIV– and TB–HIV+. Th EM content increases only at TB+HIV– group compare to healthy donors. In groups of patients with HIV infection (TB–HIV+ and TB+HIV+) a decrease in the content of these cells was observed. Thus, our work shows that the population of Th EM and Tcyt Eff could potentially be viewed as universal biomarkers for two socially significant infectious diseases: tuberculosis and HIV infection. In future experiments, it is necessary to validate these results to ensure specificity and determine the number of Th EM and Tcyt Eff specifically induced by Mtb antigens.

Key words: HIV infection, tuberculosis, flow cytometry, T-cell subsets, CD45RA, CD62L, QuantiFERON-TB Gold In-Tube.

Введение

В России туберкулез является ведущей причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией. Так, согласно оценкам ВОЗ, 11% заболевших туберкулезом (ТБ) в 2015 г., были ВИЧ-положительными [22].

Дефицит лимфоцитов CD4, возникающий при инфекции ВИЧ, значительно увеличивает

восприимчивость к инфекции *Mycobacterium tuberculosis* [13]. В связи с этим актуальной задачей является своевременное выявление туберкулеза после постановки диагноза ВИЧ-инфекции, определение групп высокого риска заболевания туберкулезом, для последующего динамического наблюдения за ними фтизиатром.

Традиционно скрининг латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) проводится с приме-

нением пробы Манту *in vivo*, при этом установленным фактом является нарастание частоты ложноотрицательных результатов у пациентов с глубокой иммуносупрессией. Ранее нами было показано, что диагностическая значимость *in vitro* теста QuantiFERON-TB Gold In-Tube не снижается у пациентов с туберкулезом на фоне ВИЧ-инфекции [1, 6]. Вместе с тем остается неясным, какие популяции клеток продуцируют IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию антигенами *M. tuberculosis* в тестах *in vitro* у ВИЧ-инфицированных пациентов, поскольку иммунодефицит, вызванный ВИЧ, обусловлен в первую очередь уменьшением относительного содержания и ослаблением функций CD4 Т-лимфоцитов [18].

На сегодняшний день установлено, что по мере дифференцировки Т-лимфоцитов их функциональная активность, как правило, увеличивается [2, 5, 14]. Поэтому степень дифференцировки является важным показателем состояния Т-клеточного иммунитета. Этот показатель характеризует функциональную активность эффекторных Т-клеток и позволяет оценить тяжесть (активность) инфекционного процесса. Дифференцировка Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции [9, 17] и туберкулезе [12, 16] как моноинфекций изучена достаточно подробно, в то время как исследования синергичного взаимодействия ВИЧ и туберкулеза на дифференцировку клеток немногочисленны и нередко противоречивы.

В связи с этим целью нашего исследования было сравнить степень дифференцировки Т-лимфоцитов CD4 и CD8 у больных туберкулезом легких и здоровых доноров на фоне ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы

За период с 2015–2016 гг. было проведено сравнительное проспективное исследование пациентов с туберкулезом органов дыхания, подтвержденным ростом *M. tuberculosis* на питательных средах, и ВИЧ-позитивных пациентов. Все лица, включенные в исследование (n = 118) были распределены на 4 группы: группу сравнения (I) составили здоровые лица (ТБ–ВИЧ–, n = 37), II — с туберкулезом без ВИЧ-инфекции (n = 28, ТБ+ВИЧ–), III — пациенты с ВИЧ-инфекцией (n = 23, ТБ–ВИЧ+), IV — с туберкулезом органов дыхания и ВИЧ-инфекцией (n = 30, ТБ+ВИЧ+). Демографическая и клиническая характеристики групп пациентов представлены в таблице 1.

Методом проточной цитометрии оценивалось абсолютное и относительное содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов (на основе экспрессии маркеров CD27, CD28, CD45RA и CD62L) в периферической крови. Пациентам с туберкулезом легких (n = 58) был выполнен тест QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Qiagen, QFT).

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика обследованных

Table 1. Clinical and demographic characteristics

		Группы			
		I ТБ–ВИЧ– ТВ–HIV– (n = 37)	II ТБ+ВИЧ– ТВ+HIV– (n = 28)	III ТБ–ВИЧ+ ТВ–HIV+ (n = 23)	IV ТБ+ВИЧ+ ТВ+HIV+ (n = 30)
Возраст Me [Q1;Q3] Age, Me [Q1;Q3]		28 [22;36]	46 [31;53]	31 [28;33]	35 [31;40]
Пол: женщины/мужчины, % Gender: men/women, %		35/65	29/71	40/60	37/66
Форма туберкулеза, % Form of tuberculosis, %	ИНФ/INF		57		53
	ДИСС/DISS	–	36	–	27
	ТБ ВГЛУ/TB ITLN		7		10
Вирусная нагрузка, копий/мл Viral load, copies/ml		–	–	16 832 [1836;47 266]	102 717 [1546;473 450]
CD4, абс. CD4, abs.	Me [Q1;Q3]	767 [693;855]	794 [545;1008]	357 [260;450]	247 [101;414]
	> 350	100%	96%	52%	37%
	200–350	0%	4%	30%	27%
	100–199	0%	0%	13%	13%
	< 100	0%	0%	4%	23%

Примечания: ИНФ — инфильтративный, ДИСС — диссеминированный, ТБ ВГЛУ — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов.

Notes: INF — infiltrative, DISS — disseminated, TB ITLN — tuberculosis of intrathoracic lymphoid nodes.

Постановку теста QFT проводили строго согласно инструкции. Образцы цельной крови (1000 мкл), стабилизированной гепарином (50 ед/мл), культивировали при 37°C в течение 18–24 ч в присутствии антигенов *M. tuberculosis* (антигениндуцированная продукция, AG), в нулевой контрольной пробирке (отрицательный контроль, NIL) и в пробирке с митогеном (положительный контроль, MIT). После окончания культивирования отбирали плазму и определяли в ней количество IFN γ методом ИФА. Результаты теста считали положительными, если разность между антигениндуцированной и спонтанной продукцией IFN γ составляла более 0,35 МЕ/мл (14 пг/мл) и разность между митогениндуцированной и спонтанной продукцией IFN γ — более 0,5 МЕ/мл (20 пг/мл). Обработку полученных результатов проводили с применением программного обеспечения QFT 2.62, предоставленного производителем.

Подготовку проточного цитометра к работе, контроль качества входящих образцов периферической крови и ее подготовку к анализу при помощи методов проточной цитометрии проводили в соответствии с рекомендациями [7].

В основу применяемого нами подхода к анализу основных стадий созревания CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов периферической крови была положена оценка уровня экспрессии двух костимуляционных молекул — CD27 и CD28 [8]. Популяция CD27⁺CD28⁺ клеток получила название «ранних» или «не праймированных» клеток, которые не содержали в своих цитоплазматических гранулах перфорины и гранзимов, но были способны эффективно пролиферировать в ответ на внесение митогенов, а также экспрессировали CCR7 на своей мембране. Однако на основании наличия или отсутствия CD45RA цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD27⁺CD28⁺ можно было разделить на две независимые группы — CD45RA-позитивные «наивные» клетки и CD45RA-негативные лимфоциты, прошедшие антиген-зависимую стадию созревания и способные специфически распознавать антигены. По мере снижения экспрессии CD27, но сохранения на поверхности CD28, CD3⁺CD8⁺ лимфоциты переходили на следующую стадию созревания, получившую название «промежуточной». Клетки этой популяции были способны проявлять цитотоксическую активность *ex vivo*, однако их цитолитический потенциал был существенно ниже такового у клеток с фенотипом CD27⁻CD28⁻. Поэтому CD27⁻CD28⁻ цитотоксические Т-клетки было предложено рассматривать в качестве «поздних» или зрелых эффекторов, содержащих в своих гранулах большое коли-

чество цитолитических молекул. В последствии даже эта популяция клеток оказалась весьма гетерогенной, поэтому для выявления эффекторных клеток было предложено применять CD45RA, экспрессия которого обнаруживается как на «наивных», так и на «терминально дифференцированных» CD3⁺CD8⁺. В ходе дальнейших исследований, среди популяции CD27⁺CD28⁺ цитотоксических Т-клеток были обнаружены лимфоциты, способные к специфическому распознаванию вируса гриппа А, некоторых этипотов цитомегаловируса и т.д. [21].

Таким образом, в настоящее время на основании экспрессии CD27, CD28, CD45RA и CD62L можно выделить следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: фенотип «наивных» клеток можно описать как CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺, клеток центральной памяти (СМ) — CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺, «транзиторных» или «переходных клеток памяти (ТМ) — CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻, зрелых эффекторных клеток — CD27⁻CD28⁻ [3]. Следует отметить, что фенотип клеток эффекторной памяти (ЕМ) в случае цитотоксических Т-лимфоцитов будет CD27⁺CD28⁻, тогда как аналогичная популяция Т-хелперов будет определяться как CD27⁻CD28⁺ [11].

Для выделения популяции лимфоцитов в периферической крови применяли моноклональные антитела против CD45 человека, конъюгированные с флуоресцентным красителем Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Т-лимфоциты периферической крови выявляли на основании наличия на клеточной мембране CD3, конъюгированного с APC (клон UCHL1, кат. № IM2467), тогда как популяции цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов, помимо CD3, несли на своей поверхности CD8 (конъюгированы с APC-Alexa Fluor 700, клон B9.11, кат. № A66332) и CD4 (конъюгированы с Pacific Blue, клон 13B8.2, кат. № A82789) соответственно. Для разделения CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на отдельные популяции клеток, находившиеся на различных стадиях дифференцировки, применяли антитела против поверхностных CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD28-PC5.5 (клон CD28.2, кат. № B24027), CD27-PC7 (клон 1A4CD27, кат. № A54823) и CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A86050). Подбор оптимальных комбинаций антител, направленных на оценку уровня экспрессии исследованных антигенов, и конъюгированных с ними флуорохромов осуществляли в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [4, 15]. Тактика «гейтирования» приведена на рисунке 1.

Для удаления эритроцитов из образцов периферической крови использовали лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Абсолютное содержание клеток исследованных популяций Т-лимфоцитов проводили с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный лазерами с длинами волн испускания 405, 488 и 638 нм. Об-

работку полученных результатов проводили с использованием пакетов программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Для статистической обработки полученных данных использовали пакеты программ MS Excel, Prizm 6.0 (GraphPad Software Inc.), Statistica 10.0. Данные представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля Me [Q1; Q3]. Для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

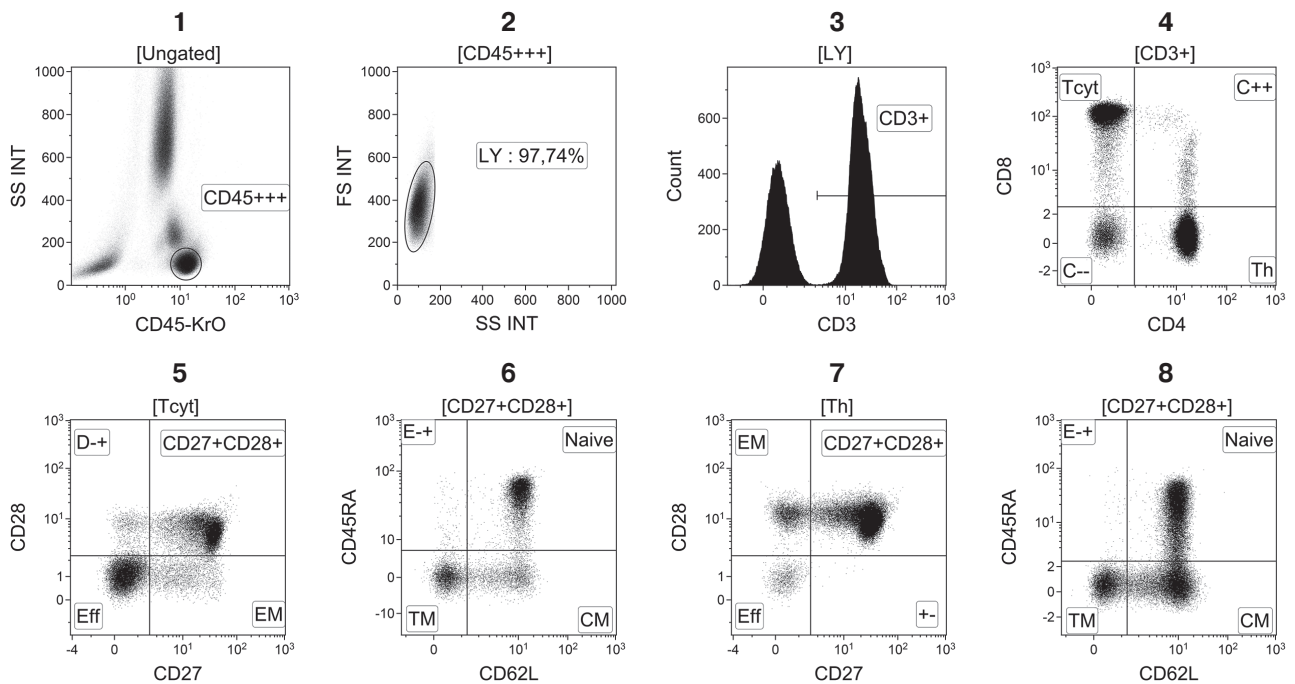


Рисунок 1. Выявление («тактика гейтирования») основных популяций Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании экспрессии поверхностных антигенов CD27, CD28, CD45RA и CD62L

Figure 1. Identification («gating tactic») of the main populations of T-helper cells and cytotoxic T-lymphocytes in peripheral blood based on the expression of surface antigen CD27, CD28, CD45RA and CD62L

Примечания. Гистограмма 1 — распределение лейкоцитов периферической крови на основании бокового светорассеяния (SS INT) и плотности экспрессии CD45 (в области «CD45+++» находятся лимфоциты); гистограмма 2 — выделение лимфоцитов на основании параметров прямого (FS, относительный размер клеток) и бокового (SS, структура клеток) светорассеяния (в области «LY» располагаются лимфоциты, которые используются для дальнейшего анализа); гистограмма 3 — выявление популяции лимфоцитов на основании экспрессии CD3 (область «CD3+» содержит все Т-лимфоциты); гистограмма 4 — распределение Т-клеток по экспрессии CD4 (ось абсцисс) и CD8 (ось ординат), областях «Tcyt» и «Th» находятся цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы, которые на основании экспрессии CD27, CD28, CD45RA и CD62L при помощи гистограмм 5 и 6, а также 7 и 8 соответственно, разделяются на отдельные субпопуляции по уровню зрелости; гистограммы 5 и 7 — анализ экспрессии CD27 и CD28 цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами периферической крови, соответственно; гистограммы 6 и 8 — анализ экспрессии CD45RA и CD62L цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами периферической крови с фенотипом CD27⁺CD28⁺ соответственно.

Notes. Bar graph 1 — the distribution of leukocytes in peripheral blood based on the side light scattering (SS INT) and the density of expression of CD45 (in there are lymphocytes in the field of «CD45+++»); bar graph 2 — the determination of lymphocytes based on the parameter of direct (FS, the relative cell size) and side (SS, cell structure) light scattering (in the field «LY» there are lymphocytes which are used for further analysis); bar graph 3 — the identification of lymphocyte populations based on the expression of CD3 (the field of «CD3+» contains all the T-lymphocytes); bar graph 4 — the distribution of T-cells by CD4 expression (axis of abscissas) and CD8 (ordinate axis), and in the fields of «Tcyt» and «Th» there are cytotoxic T-lymphocytes and T helper cells, which based on the expression CD27, CD28, CD45RA and CD62L using bar graphs 5 and 6 as well as 7 and 8, respectively, are divided into subpopulations on the level of maturity; bar graphs 5 and 7 — analysis of expression of CD27 and CD28 by cytotoxic T-lymphocytes and T-helper cells in peripheral blood, respectively; bar graphs 6 and 8 — analysis of expression of CD62L and CD45RA by cytotoxic T-lymphocytes and T helper cells in peripheral blood with the phenotype of CD27⁺CD28⁺, respectively.

Таблица 2. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови, полученные при помощи поэтапного «гейтирования» на основании первоначальной оценки экспрессии CD27 и CD28 с последующей оценкой экспрессии CD45RA и CD62L на клетках с фенотипом CD27⁺CD28⁺, Me [Q1;Q3]

Table 2. Peripheral blood T-cell subsets obtained by stepwise «gating» based on the initial assessment of CD27 and CD28 expression, followed by evaluation of CD45RA and CD62L expression within CD27⁺CD28⁺ subset, Me [Q1;Q3]

Субпопуляции Т-клеток периферической крови Peripheral blood T-cell subpopulations	Группы											
	I ТБ-ВИЧ-/ТБ-HIV- (n = 37)		II ТБ+ВИЧ-/ТБ+HIV- (n = 28)		III ТБ-ВИЧ+/ТБ-HIV+ (n = 23)		IV ТБ+ВИЧ+/ТБ+HIV+ (n = 30)					
	% LY*	абс./abs.**	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.
Tcvt N	7,90 [5,74;10,33]	141 [107;179]	4,13 [2,59;7,96]	79 [44;128]	5,09 [2,96;6,38]	71 [48;85]	2,93 [1,43;4,13]	38 [15;78]				
Tcvt CM	2,35 [2,09;3,75]	46 [33;60]	1,83 [1,15;3,02]	30 [17;53]	2,18 [1,49;3,18]	28 [17;47]	2,92 [1,53;3,80]	36 [20;68]				
Tcvt TM	4,66 [3,40;6,49]	81 [56;111]	1,97 [1,50;2,88]	34 [27;47]	3,85 [3,07;7,51]	51 [38;88]	3,67 [2,12;4,72]	47 [32;75]				
Tcvt EM	2,43 [2,00;3,00]	44 [31;54]	2,57 [1,89;5,35]	51 [30;74]	16,75 [13,22;19,85]	229 [133;359]	19,97 [13,94;6,84]	312 [140;420]				
Tcvt Eff	4,18 [1,26;8,54]	76 [21;144]	7,49 [4,63;15,27]	136 [74;259]	13,72 [9,96;19,34]	197 [155;235]	22,93 [14,53;34,24]	295 [177;540]				
Tcvt	25,65 [21,19;29,62]	415 [336;498]	25,46 [18,98;29,54]	407 [317;601]	45,09 [38,47;50]	576 [508;811]	60,81 [46,07;69,79]	889 [524;1146]				
Th N	12,68 [8,20;17,28]	223 [155;323]	15,37 [7,96;21,02]	249 [133;371]	10,09 [5,44;12,17]	130 [74;188]	4,29 [2,44;6,99]	63 [16;122]				
Th CM	17,28 [15,61;20,70]	292 [256;377]	15,04 [12,15;19,49]	291 [182;344]	7,77 [5,57;12,62]	108 [73;165]	5,16 [3,53;9,84]	93 [35;134]				
Th TM	7,19 [5,86;9,20]	123 [97;167]	4,15 [2,66;8,14]	67 [51;144]	3,37 [1,61;5,50]	40 [27;66]	2,29 [1,51;3,34]	35 [12;49]				
Th EM	3,38 [2,58;4,20]	55 [38;73]	4,17 [3,65;4,98]	77 [49;100]	1,62 [1,13;2,46]	23 [15;35]	3,13 [1,55;4,61]	37 [23;57]				
Th Eff	0,23 [0,03;1,44]	4 [1;29]	0,58 [0,37;3,11]	10 [6;49]	1,24 [0,14;3,75]	14 [2;52]	0,51 [0,15;2,13]	9 [2;28]				
Th	45,42 [40,49;49,74]	767 [693;855]	44,82 [37,93;53,74]	794 [545;1008]	29,30 [18,98;36,06]	357 [260;450]	18,73 [12,67;24,53]	247 [101;414]				
Th/Tcvt	1,76 [1,51;2,30]		1,86 [1,22;2,79]		0,58 [0,39;0,91]		0,29 [0,18;0,56]					

Примечания. * — процент от лимфоцитов; ** — абсолютное значение.
Notes: * — percentage of lymphocytes; ** — absolute value.

Результаты

На первом этапе в тесте QuantiFERON-TB Gold In-Tube мы определяли уровень $IFN\gamma_{AG-NIL}$ у пациентов с туберкулезом легких (II и IV группа). Не было выявлено значимых различий ($p = 0,643$) между частотой положительных результатов КФТ в группе ТБ+ВИЧ+ (70,0 (95% ДИ: 50,6–85,3), медиана 1,36 МЕ/мл) и ТБ+ВИЧ– (64,3 (95% CI 44,1–81,4), медиана 0,92 МЕ/мл). Графическое представление данных приведено на рисунке 2.

Далее, в соответствии с использованием гистограмм 5–8 (рис. 1), все $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD4^+$ лимфоциты были разделены на следующие субпопуляции: «наивные» клетки («naive») с фенотипом $CD27^+CD28^+CD45RA^+CD62L^+$, клетки центральной памяти (СМ) — $CD27^+CD28^+CD45RA^+CD62L^-$, «переходные» клетки памяти (ТМ) — $CD27^+CD28^+CD45RA^-CD62L^-$, клетки эффекторной памяти (ЕМ) — фенотип $CD27^+CD28^-$ для цитотоксических Т-клеток и фенотип $CD27^-CD28^+$ для Т-хелперов, а также зрелые эффекторные клетки (Т Eff) — $CD27^-CD28^-$ для обеих популяций Т-лимфоцитов. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Ввиду того, что большой интерес в настоящее время представляет поиск новых информативных биомаркеров туберкулеза и ВИЧ-инфекции, мы сформулировали 4 гипотезы (рис. 3А), для подтверждения каждой из которых оценили возможности изученных субпопуляций. Полученные различия представлены на рисунке 3Б.

Далее, с целью поиска универсальных биомаркеров, способных ответить на все четыре обозначенных нами вопроса, мы присваивали «1» в случае, если уровень значимости при сравнении двух независимых групп с использованием критерия Манна–Уитни составлял менее 0,05; в противном случае — «0». На рисунке 3В в последнем столбце приведена сумма результатов по всем четырем гипотезам исследования.

Важно отметить, что иммунорегуляторный индекс (Th/Tcut), который рассчитывается как соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$) значимо не различался в группах ТБ–ВИЧ– (I) и ТБ+ВИЧ– (II) (1,76 [1,51;2,30] против 1,86 [1,22;2,79], $p = 0,960$).

Значимые различия при сравнении всех четырех групп (IV vs II, II vs I, III vs I, IV vs III) были получены для субпопуляции $CD3^+CD8^+$ «терминально дифференцированных» (Tcut Eff, $CD27^-CD28^-CD62L^-CD45RA^-$) лимфоцитов и $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов эффекторной памяти (Th EM, $CD27^-CD28^+CD62L^-CD45RA^-$). Графическое представление данных приведено на рисунке 4.

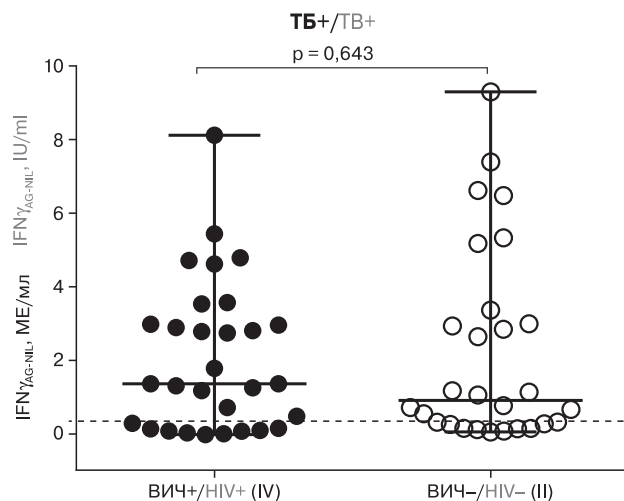


Рисунок 2. Уровень $IFN\gamma_{AG-NIL}$ в группах ТБ+ВИЧ+ (IV) и ТБ+ВИЧ– (II)

Figure 2. Level $IFN\gamma_{AG-NIL}$ in TB+HIV+ (IV) groups and TB+HIV– (II)

Примечания:

- горизонтальной линией указана медиана, диапазонами показана максимальное/минимальное значение;
- пунктирной линией обозначено пороговое значение производителя тест-системы QuantiFERON-TB Gold In-Tube (0,35 МЕ/мл);
- значимость различий между группами рассчитывалась с применением критерия Манна–Уитни.

Notes:

- the horizontal line shows the median, ranges show the maximum/minimum value;
- the dotted line represents the threshold limit value of test system producer QuantiFERON-TB Gold In-Tube (0,35 IU/ml);
- the significance of differences between groups was calculated using the Mann–Whitney test.

Установлено разнонаправленное изменение абсолютного и относительного содержания этих популяций клеток, по сравнению со здоровыми донорами, по мере возникновения туберкулеза и ВИЧ-инфекции. Абсолютное содержание «терминально дифференцированных» $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, по сравнению со здоровыми донорами (76,1 [20,7; 143,5]), увеличивается в 4 раза в группе ТБ+ВИЧ+ (295,2 [176,7; 540,2]), и в 2 раза в группах ТБ+ВИЧ– (136,2 [73,5; 259,2]) и ТБ–ВИЧ+ (197,3 [155,5; 235,4]).

В то время, как содержание $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов эффекторной памяти увеличивается только к группе ТБ+ВИЧ– (76,6 [49,1;99,9]), по сравнению со здоровыми донорами (55,0 [37,8;72,9]), в группах пациентов с ВИЧ-инфекцией (ТБ–ВИЧ+ и ТБ+ВИЧ+) наблюдается снижение содержания $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов эффекторной памяти (22,6 [15,4;34,8] и 37,2 [23,3;56,5] соответственно).

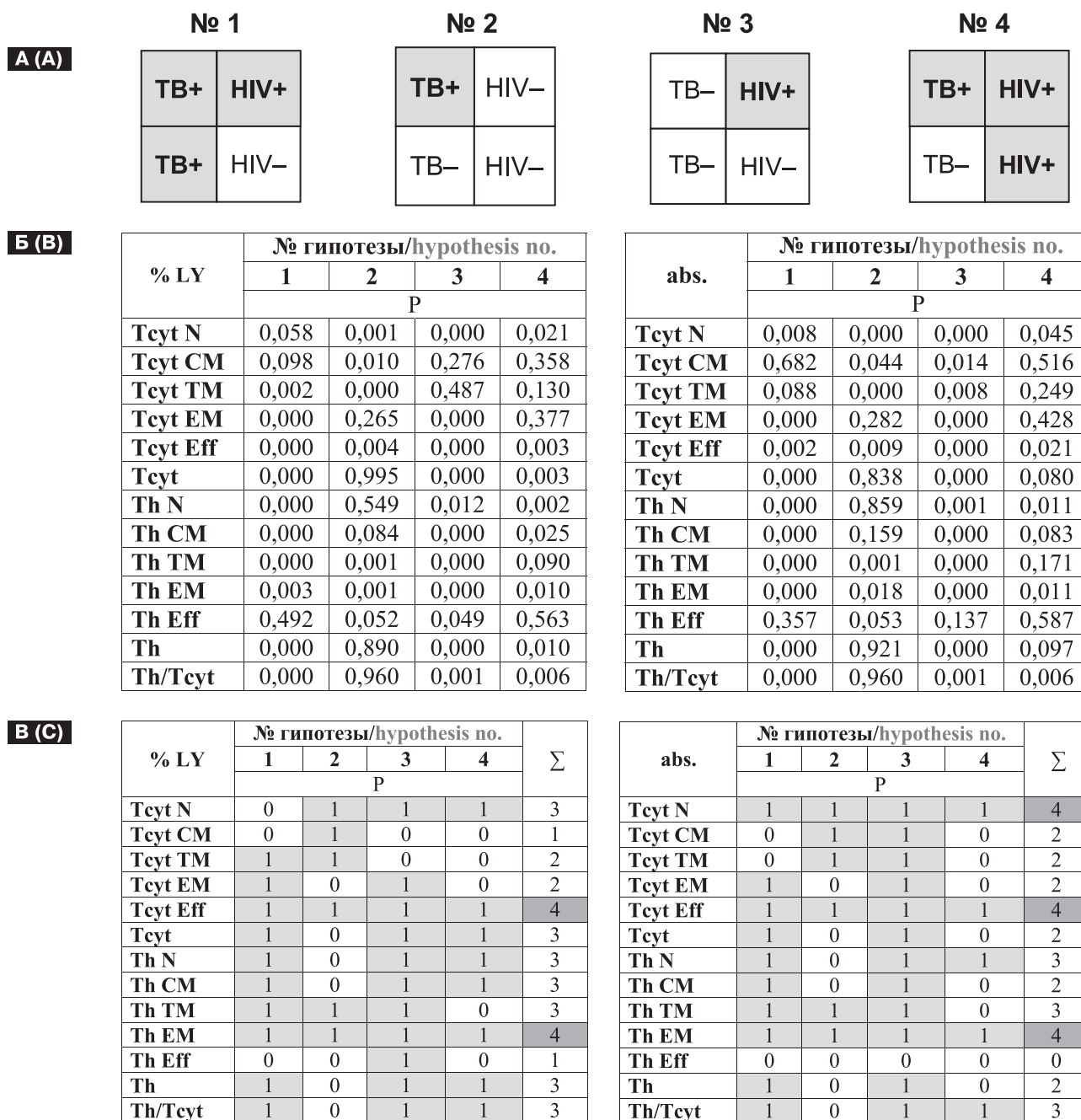


Рисунок 3. Результаты сравнения исследуемых групп между собой в соответствии с выдвинутыми гипотезами

Figure 3. The results of a comparison study groups among themselves in accordance with the hypothesis

Примечания.

А) Гипотезы исследования: 1 гипотеза — ТБ+ВИЧ+ vs ТБ+ВИЧ-; 2 гипотеза — ТБ+ВИЧ- vs ТБ-ВИЧ-; 3 гипотеза — ТБ-ВИЧ+ vs ТБ-ВИЧ-; 4 гипотеза — ТБ+ВИЧ+ vs ТБ-ВИЧ+.

Б) Уровень значимости отличий между группами, согласно выдвинутым гипотезам, с применением критерия Манна-Уитни.

В) «1» присваивалась в случае, если уровень значимости составлял менее 0,05; в противном случае — «0». В последнем столбце приведена сумма результатов по всем четырем гипотезам исследования. % LY — процент от лимфоцитов, abs. — абсолютное значение.

Notes.

A) Research hypotheses: 1 hypothesis — TB+HIV+ vs TB+HIV-; 2 hypothesis — TB+HIV- vs TB-HIV-; 3 hypothesis — TB-HIV+ vs TB-HIV-; 4 hypothesis — TB+HIV+ vs TB-HIV+.

B) The level of significance of differences among groups, according to hypothesis using the Mann-Whitney test.

C) «1» is assigned if the level of significance was less than 0.05; otherwise — «0». The last column shows the sum of results for all four hypotheses in the study. % LY — percentage of lymphocyte, abs. — absolute value.

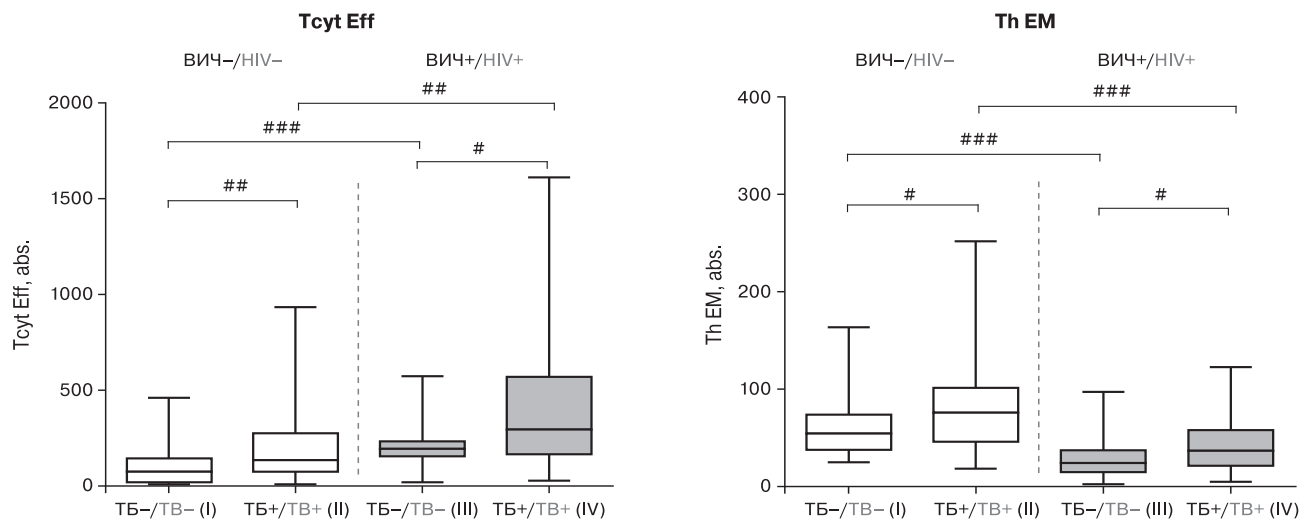


Рисунок 4. Абсолютное содержание Tcyl Eff и Th EM в периферической крови

Figure 4. The absolute content Tcyl Eff and Th EM in the peripheral blood

Примечания.

1. Горизонтальной линией указана медиана, диапазонами показана максимальное/минимальное значение.
2. Отличия между группами рассчитаны с применением критерия Манна–Уитни и обозначены следующими символами: ### — $p < 0,0005$; ## — $p < 0,005$; # — $p < 0,05$.

Notes.

1. The horizontal line shows the median, ranges show the maximum/minimum value.
2. The differences between groups were calculated using the Mann–Whitney test and were indicated by the following symbols: ### — $p < 0,0005$; ## — $p < 0,005$; # — $p < 0,05$.

Обсуждение

Истощение пула «наивных» цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов, обладающих уникальными распознающими рецепторами, может рассматриваться в качестве негативного явления у больных разных групп, так как существенно снижает эффективность распознавания и формирования специфического иммунного ответа на новые антигены, поступающие в организм больного. Более того, на фоне инфицирования ВИЧ-ТБ этот процесс приобретает более выраженный характер по сравнению с моноинфекциями. При этом в организме больных начинают доминировать клетки более зрелых фенотипов — EM и эффекторныe клетки, которые, как показывает анализ данных литературы, обладают весьма узким спектром специфичностей Т-клеточных рецепторов [10]. Следует отметить, что присутствие в циркуляции высокого числа $CD27^+CD8^+$ лимфоцитов может рассматриваться в качестве благоприятного признака, так как именно эта когорта пациентов на фоне применения АРВТ показывает максимальные приросты по относительному и абсолютному содержанию Т-хелперов в периферической крови [19].

Принимая во внимание, что при ВИЧ-инфекции имеет место непрерывная репликация вируса, а вирусные антигены не элими-

нируются из организма, то наличие большого числа цитотоксических Т-клеток, находящихся на терминальных стадиях дифференцировки, представляется вполне логичным. С другой стороны, увеличение уровня клеток эффекторной памяти свидетельствует о незавершенности иммунного ответа, так как в норме эти клетки являются переходной стадией созревания $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, которые еще не способны проявлять эффекторные функции (в первую очередь, запуск апоптоза) при контакте с клетками-мишенями.

Таким образом, гетерогенность иммунного ответа у пациентов с сочетанной патологией ВИЧ и ТБ, по сравнению с пациентами без ВИЧ-инфекции, диктует необходимость создания эффективного алгоритма ранней диагностики туберкулеза у лиц, живущих с ВИЧ.

В нашей работе показано, что $CD3^+CD4^+$ лимфоциты эффекторной памяти и «терминально дифференцированные» $CD3^+CD8^+$ лимфоциты могут потенциально рассматриваться, как универсальные биомаркеры для двух социально значимых инфекционных заболеваний: туберкулеза и ВИЧ-инфекции.

В следующих экспериментах необходимо провести валидацию полученных результатов и определить содержание Th EM и Tcyl Eff, специфичных к антигенам микобактерий.

Список литературы/References

1. Васильева Е.В., Паукер М.Н., Грицай И.Ю., Прибыток Е.В., Вербов В.Н., Тотолян Арег А. Возможности и ограничения теста QuantiFERON-TB-Gold In-Tube в лабораторной диагностике туберкулеза легких // Туберкулез и болезни легких. 2013. № 2. С. 13–17. [Vasilyeva E.V., Pauker M.N., Gritsai I.Yu., Pribytok E.V., Verbov V.N., Totolian Areg A. QuantiFERON-TB GOLD In-Tube test in the laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis: possibilities and limitations. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung diseases*, 2013, no. 2, pp. 13–17. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947–964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8 (17), no. 4, pp. 947–964. (In Russ.)]
3. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 6. С. 525–538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 6, pp. 525–538. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538 (In Russ.)]
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]
5. Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шуплетова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // Цитология. 2015. Т. 57, № 5. С. 311–318. [Sokhonenich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2015, vol. 57, no. 5, pp. 311–318. (In Russ.)]
6. Старшинова А.А., Пантелеев А.М., Васильева Е.В., Манина В.В., Павлова М.В., Сапожникова Н.В. Применение современных иммунологических методов в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Журнал инфектологии. 2015. Т. 3, № 3. С. 126–130. [Starshinova A.A., Panteleev A.M., Vasil'eva E.V., Manina V.V., Pavlova M.V., Sapozhnikova N.V. Application of modern immunological methods in the diagnosis of tuberculosis in HIV-infected patients. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 126–130. (In Russ.)]
7. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Methods. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
8. Appay V., Dunbar P.R., Callan M., Klenerman P., Gillespie G.M., Papagno L., Ogg G.S., King A., Lechner F., Spina C.A., Little S., Havlir D.V., Richman D.D., Gruener N., Pape G., Waters A., Easterbrook P., Salio M., Cerundolo V., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.*, 2002, vol. 8, no. 4, pp. 379–385. doi: 10.1038/nm0402-379
9. Brenchley J.M., Karandikar N.J., Betts M.R., Ambrozak D.R., Hill B.J., Crotty L.E., Casazza J.P., Kuruppu J., Migueles S.A., Connors M., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood*, 2003, vol. 101, no. 7, pp. 2711–2720. doi: 10.1182/blood-2002-07-2103
10. Cossarizza A., Poccia F., Agrati C., D'Offizi G., Bugarini R., Pinti M., Borghi V., Mussini C., Esposito R., Ippolito G., Narciso P. Highly active antiretroviral therapy restores CD4⁺ Vbeta T-cell repertoire in patients with primary acute HIV infection but not in treatment-naive HIV⁺ patients with severe chronic infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004, vol. 35, no. 3, pp. 213–222.
11. Curriu M., Carrillo J., Massanella M., Rigau J., Alegre J., Puig J., Garcia-Quintana A.M., Castro-Marrero J., Negro E., Clotet B., Cabrera C., Blanco J. Screening NK-, B- and T-cell phenotype and function in patients suffering from Chronic Fatigue Syndrome. *J. Transl. Med.*, 2013, no. 11: 68. doi: 10.1186/1479-5876-11-68
12. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Mischenko V.V., Sayles P., Bogacheva P., Winslow G., Apt A.S., Lyadova I.V. CD27^{low} CD4 T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27^{high} precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 2, pp. 976–985. doi: 10.4049/jimmunol.178.2.976
13. Kwan C.K., Ernst J.D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 351–376. doi: 10.1128/CMR.00042-10
14. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, vol. 43, no. 11, pp. 2797–2809. doi: 10.1002/eji.201343751
15. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, vol. 27, pp. 469–485. doi: 10.1016/j.cll.2007.05.002
16. Nikitina I.Y., Kondratuk N.A., Kosmiadi G.A., Amansahedov R.B., Vasilyeva I.A., Ganusov V.V., Lyadova I.V. Mtb-specific CD27^{low} CD4 T cells as markers of lung tissue destruction during pulmonary tuberculosis in humans. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 8: e43733. doi: 10.1371/journal.pone.0043733
17. Papagno L., Spina C.A., Marchant A., Salio M., Rufer N., Little S., Dong T., Chesney G., Waters A., Easterbrook P., Dunbar P.R., Shepherd D., Cerundolo V., Emery V., Griffiths P., Conlon C., McMichael A.J., Richman D.D., Rowland-Jones S.L., Appay V. Immune activation and CD8⁺ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.*, 2004, vol. 2, iss. 2: e20. doi: 10.1371/journal.pbio.0020020
18. Penn-Nicholson A., Nemes E., Hanekom W.A., Hatherill M., Scriba T.J. Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells are the principal source of IFN-γ in QuantiFERON assays in healthy persons. *Tuberculosis (Edinb)*, 2015, vol. 95, no. 3, pp. 350–351. doi: 10.1016/j.tube.2015.03.002

19. Seu L., Ortiz G.M., Epling L., Sinclair E., Swainson L.A., Bajpai U.D., Huang Y., Deeks S.G., Hunt P.W., Martin J.N., McCune J.M. Higher CD27⁺CD8⁺ T cells percentages during suppressive antiretroviral therapy predict greater subsequent CD4⁺ T cell recovery in treated HIV infection. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 12: e84091. doi: 10.1371/journal.pone.0084091
20. Siddiqui S., Sarro Y., Diarra B., Diallo H., Guindo O., Dabita D., Tall M., Hammond A., Kassambara H., Goita D., Demebele P., Traore B., Hengel R., Nason M., Warfield J., Washington J., Polis M., Diallo S., Dao S., Koita O., Lane H.C., Catalfamo M., Tounkara A. Tuberculosis specific responses following therapy for TB: impact of HIV co-infection. *Clin. Immunol.*, 2015, vol. 159, iss. 1, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.clim.2015.04.002
21. Van Aalderen M.C., Remmerswaal E.B., Ten Berge I.J., Van Lier R.A. Blood and beyond: properties of circulating and tissue-resident human virus-specific $\alpha\beta$ CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, iss. 4, pp. 934–944. doi: 10.1002/eji.201344269
22. WHO. Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing. *WHO report*, 2016.

Авторы:

Васильева Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансляционной биомедицины ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия; доцент кафедры иммунологии, ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Максимов Г.В., к.м.н., зав. отделением № 4 для больных туберкулезом легких, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, хроническими вирусными гепатитами ГБУЗ Городской противотуберкулезный диспансер, Санкт-Петербург, Россия;

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

Серебрякова М.К., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ткачук А.П., к.б.н., зав. лабораторией трансляционной биомедицины ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Тотolian Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Vasileva E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Translational Biomedicine, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia; Pavlov First State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Maximov G.V., PhD (Medicine), Head of the Department No. 4, City Anti-Tuberculosis Dispensary, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Serebriakova M.K., Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Tkachuk A.P., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Translational Biomedicine, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Immunology Department, Pavlov First State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ОЧАГОВ КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.С. Пименова¹, О.Ю. Борисова^{1,2}, О.В. Цвиркун¹, А.А. Басов¹, В.А. Алешкин¹,
С.С. Афанасьев¹, Е.Е. Донских², А.П. Пикина², Л.И. Кафарская²,
М.С. Афанасьев³, А.В. Караулов³

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

²ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Цель исследования: оценка эффективности применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании контактных лиц в очагах коклюшной инфекции. *Материалы и методы.* Под наблюдением находилось 4930 человек из 8 общеобразовательных учреждений г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Изучено 430 проб клинического материала. В исследование были включены учащиеся 1–9, 11 классов и работники образования различных категорий. Исследования проводили согласно методическим рекомендациям МР 3.1.2.0072-13. Экстракцию ДНК *B. pertussis* из исследуемых образцов проводили с помощью тест-системы «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ». Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли методом ПЦР-РТ с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» и методом ПЦР при изотермальных условиях с оригинальной комбинацией праймеров. *Результаты.* Из обследуемых контактных лиц в очагах коклюшной инфекции в 80,9% были дети и 19,1% — взрослые. В трех из восьми образовательных учреждений ранее были выявлены случаи коклюша у 7 детей в возрасте 7, 9, 11 и 15 лет. Диагноз коклюша у них был подтвержден в одном случае с помощью бактериологического метода и в шести случаях — с помощью серологических методов (ИФА и РНГА). Обнаружено 33 положительных ДНК-образца (7,7% от общего числа проб). ДНК-положительные образцы выделены от 18 учащихся и 15 работников образовательных учреждений. Среди учащихся положительные образцы в основном обнаружены у учеников 4-х классов в возрасте 10–11 лет. Среди работников образовательных учреждений ДНК-положительные образцы в большинстве (33,3%) случаев выделены от педагогов, а также от медицинского персонала и работников столовой. В двух очагах, где ранее были установлены источники инфекции, обнаружено 15 ДНК-положительных образцов, при этом у троих обследованных с ДНК-позитивными пробами наблюдались клинические проявления. В тех оча-

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А.,
Афанасьев С.С., Донских Е.Е., Пикина А.П., Кафарская Л.И.,
Афанасьев М.С., Караулов А.В., Бессолицына Е.А., Волков С.А.,
Столбова Ф.С. Эффективность применения молекулярно-генетической
диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции //
Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 162–170. doi: 10.15789/2220-
7619-2017-2-162-170

Citation:

Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvircun O.V., Basov A.S., Aleshkin V.A.,
Afanasiev S.S., Donskich E.E., Pikina A.P., Kafarskaya L.I., Afanasiev M.S.,
Karaulov A.V. Efficiency of application of molecular-genetic diagnostics
in case of inspection of the schools of a whooping cough // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 162–
170. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-162-170

гах, где ранее не был установлен источник инфекции и проводили обследования длительно кашляющих детей, обнаружено 18 ДНК-положительных образцов, причем у двух обследованных с ДНК-положительными пробами отмечались клинические проявления в виде кашля. *Заключение.* Проведенные исследования подтвердили высокую эффективность применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов коклюшной инфекции для установления источника инфекции и при наличии длительно кашляющих детей.

Ключевые слова: коклюш, молекулярно-генетическая диагностика, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в режиме реального времени, изотермальная амплификация, *Bordetella pertussis*.

EFFECTIVENESS OF MOLECULAR-GENETIC DIAGNOSTICS DURING PERTUSSIS INFECTION FOCI EXAMINATION

Pimenova A.S.^a, Borisova O.Yu.^{a,b}, Tsvircun O.V.^a, Basov A.S.^a, Aleshkin V.A.^a, Afanasiev S.S.^a, Donskich E.E.^b, Pikina A.P.^b, Kafarskaya L.I.^b, Afanasiev M.S.^c, Karaulov A.V.^c

^a G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

^c Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purpose: whooping cough diagnostics by molecular-genetic methods. *Materials and methods.* Under observation there were 4930 people during the period from 2012 to 2015. All samples were received in 8 schools of Moscow and the Moscow region: in 3 schools had been found children with whooping cough, in other 5 schools – only children with prolonged cough. Whooping cough diagnosis had been given earlier by bacteriological and serological methods. 430 clinical samples were studied by 2 methods: PCR with fluorescent hybridized detection of amplified products and isothermal amplification. *Results.* In three of eight schools whooping cough cases at 7 children at the age of 7, 9, 11 and 15 years were revealed earlier. The diagnosis of whooping cough at them was confirmed by means of bacteriological and serological methods. 33 positive DNA samples (7.7%) are revealed. DNA-positive samples are allocated from 18 pupils and 15 employees of schools. In two schools where earlier infection sources were established, 15 DNA-positive samples from which in three cases clinical manifestations were observed are revealed. In those schools where it wasn't earlier established a source of an infection and examinations conducted it is long the coughing children, 18 DNA-positive samples are revealed, and in two cases clinical manifestations in the form of cough were observed. *Conclusion.* Performed research confirmed high effectiveness of molecular-genetic methods during pertussis infection foci examination in schools for infection source identification also amongst long coughing children.

Key words: whooping cough, molecular-genetic methods, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, isothermal amplification, *Bordetella pertussis*.

Введение

Коклюш — инфекционное респираторное заболевание человека, вызываемое граммотрицательными бактериями *Bordetella pertussis*, характеризующееся тяжелым течением, высокой летальностью у новорожденных и детей первого года жизни, которая обусловлена развитием различного вида осложнений. Передача инфекции происходит воздушно-капельным путем и возможна только при тесном общении с больным или носителем; индекс контагиозности колеблется от 0,7 до 1,0.

Несмотря на успехи вакцинации, коклюш остается причиной детской морбидности и летальности и серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. По данным ВОЗ, в мире ежегодно заболевает коклюшем около 60 млн человек и умирает около 1 млн детей, преимущественно в возрасте до 1 года жизни [15].

Массовая специфическая иммунопрофилактика коклюша в Российской Федерации привела к значительному улучшению эпидемиологической обстановки и показала социально-экономическую значимость вакцинопрофилактики для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции в России [1, 3]. Благодаря достижению и поддержанию высокого охвата вакцинацией и ревакцинацией АКДС-вакциной, заболеваемость коклюшем в Российской Федерации за последние 5 лет стабилизировалась на уровне 3,0–5,0 на 100 тыс. населения [4]. Во внутригодовой динамике наблюдается сглаживание цикличности, что свидетельствует о снижении роли сезонных факторов в поддержании эпидемического процесса коклюша. Несмотря на это, регистрируются локальные вспышки с формированием очагов разной интенсивности в школьных коллективах. Как известно, в очагах коклюшной инфекции прививки

контактным лицам не проводятся, а противоэпидемические мероприятия в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами 3.1.2.3162-14 «Профилактика коклюша» сводятся к медицинскому наблюдению и выявлению кашляющих детей для бактериологического или молекулярно-генетического обследования с диагностической целью.

Учитывая, что технологии, основанные на различных вариантах амплификации фрагментов генома возбудителей инфекционных заболеваний, получили широкое распространение [1, 8, 9, 10, 12] благодаря возможности ускоренной прямой детекции микроорганизма, высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости, целью работы явилась оценка целесообразности и эффективности применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании контактных лиц в очагах коклюшной инфекции.

Материалы и методы

Исследовано 430 проб клинического материала, полученных в 2012–2015 гг. от контактных лиц из очагов коклюшной инфекции в образовательных учреждениях г. Москвы и Московской области.

В исследование были включены учащиеся 1–9, 11 классов и работники образования различных категорий (административно-управленческий персонал, педагогические работники, медицинские работники, работники столовой, технический и обслуживающий персонал), что составило 80,9 и 19,1% соответственно. Среди обследованных 59,1% приходился на долю женщин, а 40,9% — на долю мужчин. Возрастной состав был представлен следующим образом: в возрасте 6–7 лет — 6 (1,4%), 8–9 лет — 97 (22,6%), 10–11 лет — 106 (24,6%), 12–13 лет — 46 (10,7%), 14–15 лет — 92 (21,4%), 16–17 лет — 1 (0,2%), 20–29 лет — 5 (1,2%), 30–39 лет — 18 (4,2%), 40–49 лет — 19

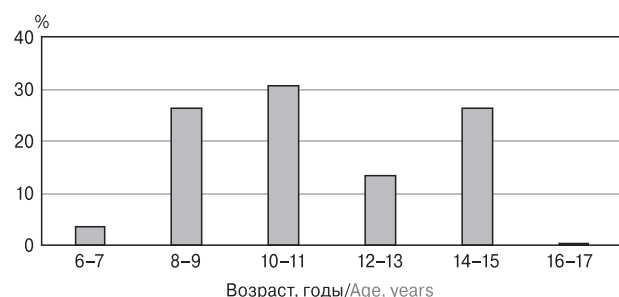


Рисунок 1. Возрастная структура обследуемых учащихся

Figure 1. Age structure of examined pupils

(4,4%), 50–59 лет — 27 (6,3%), 60–69 лет — 11 (2,5%) и 70–79 лет — 2 (0,5%). У 10 (2,3%) обследуемых на момент забора биологического материала отмечалось наличие клинических проявлений респираторной инфекции.

Взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки производили двумя стерильными одноразовыми сухими коммерческими тампонами («Сорап», Италия) с последующим их помещением в пробирку типа эппендорф с транспортной средой; доставку, хранение и подготовку биологического материала к ПЦР-исследованию осуществляли в соответствии с МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша». Экстракцию ДНК *B. pertussis* из исследуемых образцов проводили согласно инструкции по применению комплекта реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва).

Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene Q 5 plex HRM («QIAGEN GmbH», ФРГ) согласно методическим рекомендациям по применению набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва).

Также специфические фрагменты генома возбудителя коклюша выявляли методом ПЦР при изотермальных условиях с оригинальной комбинацией праймеров. Реакционная смесь содержала 10x буфер ПЦР, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, Bst полимеразу и три пары праймеров — BP-F3 и BP-B3, BP-F1P и BP-B1P, BP-LF и BP-LB — в окончательном объеме 27 мкл. Амплификацию выполняли в изотермальном режиме: 65°C — 60 мин; 80°C — 2 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили путем горизонтального электрофореза в 2,0% агарозном геле при 120 В в течение 1 ч с последующим сравнением электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК *B. pertussis* с подвижностью контрольного образца. В качестве положительного контроля ПЦР использовали ДНК *B. pertussis* №143 (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск). Учет результатов реакции осуществляли с помощью гель-документирующей системы с выдвижным трансиллюминатором Quantum-ST-4-1100/26M («Vilber Lourmat», Франция).

Результаты

Проведено первичное обследование контактных лиц в 8-ми очагах коклюшной инфекции в образовательных учреждениях г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Под медицинским наблюдением в общей сложности находилось 4930 человек. Клинический материал получен от 430 людей.

Из обследуемых контактных лиц в очагах коклюша 80,9% составили дети и 19,1% — взрослые. Среди обследуемых детей, большинство (84,8%) составили дети возрастных групп — 8–9, 10–11 и 14–15 лет (рис. 1).

Среди взрослых преобладали (64%) лица в возрасте 30–39, 40–49 и 50–59 лет (рис. 2).

В трех из восьми образовательных учреждениях ранее были выявлены случаи коклюша у 7 детей в возрасте 7, 9, 11 и 15 лет, которые были учениками 1, 3–5 и 9 классов, из них четверо детей были из одного очага. Диагноз коклюша у них был подтвержден в одном случае (14,3%) с помощью бактериологического метода и в 6 случаях (по 42,8%) — с помощью серологических методов (ИФА и РНГА). В остальных пяти образовательных учреждениях были проведены обследования контактных лиц с целью выявления больных на разных стадиях заболевания и источника инфекции с помощью молекулярно-генетических методов диагностики.

Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли двумя методами — методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» и методом изотермальной амплификации с оригинальной комбинацией праймеров.

В очаге № 1 всего под наблюдением находилось 263 человека и обследовано 28 человек, из них в возрасте 20–29 лет — 3,6%, 30–39 лет — 28,6%, 40–49 лет — 17,8%, 50–59 лет — 28,6%, 60–69 лет — 17,8% и старше 70 лет — 3,6% человек. В данном очаге ранее было выявлено 4 больных коклюшем, из них 1 ребенок 7 лет, 2 детей 9 лет и 1 ребенок 15 лет, которые являлись учениками 1, 2 и 9 классов соответственно. Диагноз коклюша был установлен с помощью серологических методов исследования (в одном случае — с помощью ИФА и в трех случаях — с помощью РНГА). Обследование проведено на 35 день существования очага коклюшной инфекции. При обследовании данного очага у 5 (17,8%) человек наблюдались клинические проявления в виде кашля. Среди них 3 человека были педагогами,

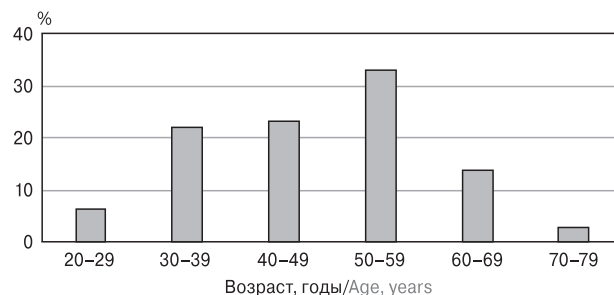


Рисунок 2. Возрастная структура обследуемых взрослых лиц

Figure 2. Age structure of examined adults

1 библиотекарь и 1 воспитатель. ДНК возбудителя коклюша была выявлена с помощью двух методов в 12 (42,8%) случаях, причем в двух случаях у лиц, имевших клинические проявления. Результаты, полученные с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» и метода изотермальной амплификации, полностью коррелировали. Положительные ДНК-образцы обнаружены у 8 педагогов, медицинской сестры и трех работников столовой, возрастной состав: 30–39 лет — 4, 40–49 лет — 1, 50–59 лет — 5 человек и по одному человеку в возрасте 60–69 лет и старше 70 лет. У всех остальных обследованных лиц были отрицательные результаты ПЦР-диагностики.

В очаге № 2 под наблюдением находилось 406 человек и обследовано 30 человек, из них 19 (63,3%) учащихся и 11 (36,7%) работников школы, 40% — мужского и 60% — женского пола. Все учащиеся были учениками одного класса. В этом классе был ранее выявлен больной коклюшем ученик (11 лет), у которого диагноз установлен серологически с помощью ИФА. Возрастной состав обследованных лиц — 11–14 лет (63,3%), 30–39 лет 27,3%, 40–49 лет — 27,3%, 50–59 лет — 27,3%, 60–69 лет — 18,1% человек. На основании эпидемиологического расследования число контактных лиц было увеличено за счет сотрудников школы, которые имели контакт с большим числом учащихся (работники столовой и групп продленного дня, классные руководители). При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов положительных ДНК-образцов не было обнаружено.

В очаге № 3 под наблюдением находилось 706 человек и обследовано 30 человек, все были учащимися. Из них в возрасте 6–7 лет — 6 (20%), 8–9 лет — 19 (63,3%) и 10–11 лет — 5 (16,7%) человек, которые являлись учениками 1, 2, 3 и 4 классов; мальчиков и девочек было равное количество — по 15 человек (50%). Ранее в этом очаге не было выявлено больных ко-

клюшем, однако регистрировались длительно кашляющие дети. При обследовании очага обнаружено два ребенка из одного класса, у которых выявлена ДНК возбудителя коклюша, причем у одного из них на момент взятия патологического материала были клинические проявления в виде кашля. У остальных обследованных лиц результаты, полученные с помощью двух методов, были отрицательные.

В очаге № 4 всего под наблюдением находилось 649 человек и обследовано 26 человек, из них 25 (96,2%) учащихся и 1 (3,8%) учитель, 65,4% — мужского и 34,6% — женского пола. Все учащиеся были учениками одного 4 класса в возрасте 9–10 лет и учитель (классный руководитель) в возрасте 30 лет. В данном очаге ранее было выявлено 2 больных коклюшем, из них 1 ребенок 11 лет 1 ребенок 15 лет, которые являлись учениками 4 и 9 классов соответственно. Диагноз коклюша был установлен с помощью ИФА у ученика 4 класса и ученика 9 класса — с помощью бактериологического метода. Обследование проведено на 20 день существования очага коклюшной инфекции. При обследовании данного очага у одного ребенка (3,8%), ученика 4 класса, наблюдались клинические проявления в виде кашля. ДНК возбудителя коклюша была выявлена в 2 (7,7%) случаях (ученики 4 класса) с помощью двух методов, причем в обоих случаях у этих лиц клинические проявления не наблюдались, и в одном случае (3,5%) ДНК возбудителя коклюша обнаружена с помощью метода изотермальной амплификации у ребенка 4 класса с клиническими проявлениями. У всех остальных обследованных лиц результаты ПЦР-диагностики были отрицательные.

В очаге № 5 под наблюдением находилось 352 человека и обследован 31 человек, все были учащимися 2 класса, из них 51,6% — мужского и 48,4% — женского пола. Обследование проводилось по первому случаю, подозрительному на коклюш, при этом в классе находились длительно кашляющие дети. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов положительных ДНК-образцов не было обнаружено.

В очаге № 6 всего под наблюдением находилось 985 человек и обследовано 130 человек, из них 96 (73,8%) учащихся и 34 (26,2%) работников школы, 42 (32,3%) — мужского и 88 (67,7%) — женского пола. Возрастной состав обследованных учащихся распределился следующим образом: в возрасте 8–9 лет — 2 (1,5%), 10–11 лет — 42 (32,3%), 12–13 лет — 32 (24,6%), 14–15 лет — 19 (14,6%), которые были учениками 3, 4, 6, 7, 8, 9 и 11 классов. Возрастной состав

обследованных взрослых: 20–29 лет — 4 (3,1%), 30–39 лет — 4 (3,1%), 40–49 лет — 9 (6,9%), 50–59 лет — 13 (10%), 60–69 лет — 3 (2,3%) человек и старше 70 лет — 1 (1,6%) человек. Наряду с учениками были обследованы сотрудники образовательного учреждения, среди которых 91,2% педагогов, 2,9% работников административно-управленческого аппарата и 5,9% технический персонал и буфетчицы. Обследование не только длительно кашляющих, но и контактных лиц было организовано по первым случаям, подозрительным на коклюш. При обследовании данного очага с помощью метода изотермальной амплификации обнаружено 12 положительных ДНК-образцов, из них 7 образцов у детей, учеников 4, 6, и 9 классов, и 2 — у взрослых (учителя). Из 12 ДНК-положительных образцов, с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» обнаружено 9 положительных результатов. В трех случаях выявлены расхождения: в одном случае (ученик 6 класса) обнаружено ДНК представителя рода *Bordetella* spp. и в двух случаях (1 ученик 4 класса и 1 учитель) получен отрицательный результат. Во всех остальных случаях с помощью двух молекулярно-генетических методов получены отрицательные результаты.

В очаге № 7 всего под наблюдением находилось 514 человек и обследовано 45 человек, из них 43 (95,6%) учащихся и 2 (4,4%) учителя, 44,4% — мужского и 55,6% — женского пола. Все учащиеся были учениками 3 классов в возрасте 8–9 лет и учителя (классные руководители) в возрасте 39 и 45 лет. Ранее в этом очаге не было выявлено больных коклюшем, однако регистрировались длительно кашляющие дети. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов положительных ДНК-образцов не было обнаружено. При обследовании данного очага с помощью метода изотермальной амплификации обнаружено 2 положительных ДНК-образца у детей, причем у одного из них на момент обследования были клинические проявления в виде кашля. Данные образцы с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» оказались отрицательными. Во всех остальных случаях (95,6%) с помощью обоих методов выявлены отрицательные результаты ПЦР-диагностики.

В очаге № 8 всего под наблюдением находилось 1055 человек и обследовано 110 человек, из них 104 (94,5%) учащихся и 6 (5,5%) работников школы, 49 (44,6%) — мужского и 61 (55,4%) — женского пола. Возрастной состав обследованных учащихся распределился следующим образом: в возрасте 8–9 лет — 5 (4,5%),

10–11 лет — 20 (18,2%), 12–13 лет — 7 (6,4%), 14–15 лет — 72 (65,4%), которые были учениками 4-х, 8-х, 9-х классов. Возрастной состав обследованных взрослых: 31, 49, 50, 53 и 61 лет. Все обследованные взрослые были классными руководителями. Ранее в этом очаге не было выявлено больных коклюшем, однако регистрировались длительно кашляющие дети. На момент обследования очага у двух детей (учеников 4-х классов) были клинические проявления в виде кашля. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов обнаружено 2 положительных ДНК-образца у учеников 4 классов и один положительный ДНК-образец (у ученика 8 класса) обнаружен в методе изотермальной амплификации, который с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» идентифицирован как ДНК представителя рода *Bordetella* spp. Во всех трех случаях у обследованных лиц клинических проявлений не было.

Обсуждение

Несмотря на высокий уровень иммунизации, коклюш остается актуальной инфекцией во всем мире. В последние 10 лет высокая заболеваемость коклюшем регистрируется в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками (Австрия, Норвегия, Польша, Нидерланды, Великобритания, Австралия и США) [5, 6, 7, 13, 14]. Так, около 5000 случаев коклюша было зарегистрировано в 2012 г. в Вашингтоне, что является максимальным показателем за последние 70 лет. В Японии наибольший эпидемический подъем заболеваемости был 2008–2010 гг., когда было зарегистрировано 17 349 случаев коклюша [11, 12]. Рост заболеваемости коклюшем объясняется целым рядом факторов, в том числе недостатками вакцинации ацеллюлярными вакцинами, адаптацией возбудителя под селективным давлением иммунизации [6], а также широким внедрением молекулярно-генетических методов диагностики. Кроме того, были показаны возможности и доказана эффективность применения с диагностической целью молекулярно-генетических методов одновременной детекции возбудителя коклюша и возбудителей воздушно-капельных вирусных инфекций [10, 12, 13].

В настоящее время лабораторная диагностика коклюша в России основывается на использовании трех методов — бактериологического, молекулярно-генетического и серологического, которые применяются в зависимости от сроков начала заболевания. Однако

проведение бактериологического исследования имеет целый ряд недостатков: занимает продолжительное время (от 5 до 7 дней); эффективность выделения в практических условиях не превышает 10–15%; трудности культивирования, связанные с сниженной выживаемостью во внешней среде, биологическими свойствами возбудителя коклюша; отсутствие в настоящее время диагностических агглютинирующих сывороток. Кроме того, результативность бактериологической диагностики зависит от сроков обследования: в более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость возбудителя коклюша резко снижается, кроме того могут быть ошибки на этапах взятия и транспортировки исследуемого материала. Поэтому применение бактериологической диагностики ограничено использованием ее на ранних сроках заболевания (в первые 2–3 недели от начала заболевания).

Серологическая диагностика коклюша проводится с помощью ИФА и применяется для определения уровня специфических противокклюшных антител классов IgM, IgA, IgG. Данный метод имеет ограничения по срокам использования, так как результативен не ранее 3–4 недели от начала заболевания, и информативен для невакцинированных детей старше 1 года и взрослых. Также существует сложность интерпретации результатов серологического обследования у привитых детей и отмечается низкая продукция противокклюшных антител у детей в возрасте до 1 года. Поэтому бактериологические и серологические методы исследования, несмотря на многолетний успешный опыт их применения, имеют ряд ограничений, главное из которых — продолжительность исследования, что существенно затрудняет раннюю диагностику инфекции, раннее начало этиотропной терапии и своевременное проведение противоэпидемических мероприятий в очагах инфекции.

В последнее десятилетие технологии, основанные на различных вариантах амплификации фрагментов генома возбудителей инфекционных заболеваний, получили широкое распространение благодаря возможности прямой детекции микроорганизма, высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости методов. Кроме того, сами методики тестирования достаточно просты и могут быть использованы в любой лаборатории, проводящей ПЦР-исследования, и в последние годы активно автоматизируются, с целью минимизации прямого участия исследователя. В последнее десятилетие разработано значительное количество вариантов методов амплификации

нуклеиновых кислот для идентификации возбудителя коклюша, основанные на выявлении различных мишеней в геноме *B. pertussis* как в классическом варианте с электрофорезом, так и в режиме реального времени и изотермальной амплификации [2, 8, 9, 10, 11, 12].

В настоящей работе нами изучена и показана целесообразность и эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании в очагах коклюшной инфекции не только длительно кашляющих детей, но и здоровых контактных лиц. Всего под наблюдением находилось 4930 человек из 8 общеобразовательных учреждений г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Изучено 430 проб клинического материала.

В ходе проведенных исследований обнаружено 33 положительных ДНК-образца, что составило 7,7% от общего числа исследованных проб. ДНК-положительные образцы были выделены от 18 (54,5%) учащихся и 15 (45,5%) работников образовательных учреждений различных категорий. Среди учащихся положительные образцы обнаружены у учеников 2–4, 6 и 9 классов в возрасте 8–9 лет — 15,1%, 10–11 лет — 27,3%, 12–13 лет — 9,1% и 14–15 лет — 3,0%, то есть среди обследованных по контакту детей основная доля приходилась на учеников 4-х классов в возрасте 10–11 лет. Среди работников образовательных учреждений ДНК-положительные образцы выявлены в материале лиц в возрасте 30–39 и 50–59 лет — по 15,1%, 40–49 и 60–69 — по 6,1%, и старше 70 лет — 3,0%; из них большинство (33,3%) были педагогами; медицинские работники и работники столовой составили 3,0 и 9,1% соответственно. В трех очагах, где ранее были установлены источники инфекции, нами обнаружено 15 (17,9%) ДНК-положительных образцов, при этом у троих обследованных с ДНК-позитивными пробами наблюдались клинические проявления.

В тех очагах, где не был ранее установлен источник инфекции и проводили обследования длительно кашляющих детей, обнаружено 18 (5,2%) ДНК-положительных образцов, причем у двух обследованных с ДНК-положительными пробами отмечались клинические проявления в виде кашля.

Анализ результатов по обследуемым очагам показал, что в двух из них, где ранее не был установлен источник инфекции, но были обследованы длительно кашляющие дети, положительные ДНК-образцы с помощью двух молекулярно-генетических методов не обнаружены, что может свидетельствовать о наличии в этих очагах респираторных инфекций другой этиологии.

Интересным является тот факт, что при обследовании очагов в общеобразовательных учреждениях положительные ДНК-образцы (33,3% случаев от общих положительных находок) выявляются не только среди детей, но и у взрослых, большинство из которых это педагогические работники, имеющие наибольший контакт с детьми.

При изучении клинического материала с помощью метода изотермальной амплификации у 33 лиц обнаружена ДНК возбудителя коклюша и при использовании коммерческой тест-системы ДНК возбудителя выявлена у 27 лиц. Причем в 5 (15,2%) случаях применение метода изотермальной амплификации позволило обнаружить ДНК возбудителя коклюша у лиц с клиническими проявлениями, в то время как при использовании коммерческой тест-системы только в трех из этих пяти случаев были получены положительные результаты. У лиц без клинических проявлений с помощью изотермальной амплификации обнаружено 28 положительных образцов, в то время как из них, с помощью коммерческой тест-системы, в двух случаях не было положительных результатов и в одном случае результатом исследования явилось обнаружение ДНК микроорганизмов рода *Bordetella* spp. Расхождения между результатами, полученными с помощью метода изотермальной амплификации и метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени, по-видимому объясняется тем, что метод изотермальной амплификации обладает более высокой чувствительностью за счет использования трех пар специфических праймеров на один фрагмент генома возбудителя коклюша, кодирующего ген коклюшного токсина. В одном случае в результате изотермальной амплификации был получен отрицательный результат, а при использовании коммерческой тест-системы обнаружена ДНК микроорганизма рода *Bordetella* spp., что может быть обусловлено наличием в одном очаге разных видов бордетелл.

Положительные результаты молекулярно-генетических исследований не всегда свидетельствуют о наличии заболевания; для постановки окончательного диагноза коклюша необходимо учитывать клинические проявления инфекции, наличие эпидемиологической связи с лабораторно-подтвержденным случаем.

Для оценки эффективности молекулярно-генетических методов мы сравнили результативность ПЦР-диагностики и бактериологического методов на примере Московской области в ранее проведенных исследованиях.

В 7 очагах 317 контактных лиц обследовали с использованием ПЦР-диагностики на разных сроках существования очага, границы очагов были расширены, и медицинское наблюдение проводилось за 3875 детьми в течение инкубационного периода (21 день). При обследовании было выявлено 23 больных, что составило 7,3%, тогда как при бактериологическом обследовании около 1,5 тысяч контактных было выявлено всего 0,3% (5 человек).

Если предположить, что метод ПЦР использовался бы в 338 очагах, при обследовании более 10 тысяч контактных лиц, то было бы выявлено более 700 больных коклюшем, в том числе, легкими и субклиническими формами. Все это существенно приблизило бы к истинному числу заболевших коклюшем, сократив число возможных пропущенных случаев заболевания.

Следовательно, применение молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции позволяет выявить ДНК возбудителя коклюша у контактных лиц при их обследовании и установить больных со стертой,

атипичной формой заболевания. Кроме того, исследования с помощью этих технологий в качестве противоэпидемических мероприятий в очагах дает возможность в короткие сроки обнаружить источник инфекции, а также выявить скрытый источник инфекции в виде бактерионосителей.

Заключение

Проведенные исследования подтвердили целесообразность и эффективность применения молекулярно-генетических методов при обследовании не только кашляющих, но и контактных в очагах коклюшной инфекции, а также показали преимущества данного метода перед бактериологическим и серологическим лабораторными исследованиями. В очагах коклюшной инфекции, где было зарегистрировано вторичное распространение инфекции, удалось выявить 17,9% ДНК-положительных образцов возбудителя коклюша и в очагах при обследовании по первым случаям, подозрительным на коклюш, обнаружено 5,2% ДНК-положительных образцов возбудителя коклюша.

Список литературы/References

1. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2013. № 1. С. 42–51. [Onischenko G.G. Epidemiological well-being of population of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 1, pp. 42–51. (In Russ.)]
2. Прадед М.Н., Яцышина С.Б., Селезнева Т.С., Малинина С.В., Бирюлева Н.В., Любимова Т.Е., Воробьева Н.С. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 1. С. 53–56. [Praded M.N., Yatsyshyna S.B., Selezneva T.S., Malinina S.V., Birulyeva N.V., Lubimova T.Ye., Vorobyeva N.S. The kit of reagents for polymerase chain reaction diagnostic of infections caused by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)]
3. Селезнева Т.С., Титова Н.С., Заргарьянц А.И., Максимова Н.М., Маркина С.С. Влияние вакцинопрофилактики на эпидемический процесс управляемых инфекций в Российской Федерации // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002. № 2. С. 6–11. [Selezneva T.S., Titova N.S., Zargaryants A.I., Maksimova N.M., Markina S.S. Effect of vaccination on the epidemic process of vaccine-preventable diseases in Russian Federation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2002, no. 2, pp. 6–11. (In Russ.)]
4. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2015 года. [Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchiya cheloveka: infektsionnaya zaboлеваemost' v Rossiiskoi Federatsii za yanvar'-dekabr' 2015 goda]. URL: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statictic_details.php?ELEMENT_ID=5525 (07.10.2016)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis – United States, 1997–2000. *MMWR Morb. Mortal. WKLY Rep.*, 2002, vol. 51, no. 4, pp. 73–76.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis Epidemic – California, 2014. *MMWR Morb. Mortal. WKLY Rep.*, 2014, vol. 63, no. 48, pp. 1129–1132.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis Epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. WKLY Rep.*, 2012, vol. 61, no. 28, pp. 517–522.
8. King A.J., Van Gakom T., Van der Heide H.G., Advani A., Van der Lee S. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genom.*, 2010, no. 11: 64. doi: 10.1186/1471-2164-11-64
9. Litt D.J., Jauneikaite E., Tchipeva D., Harrison T.G., Fry N.K. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 61, no. 12, pp. 1662–1668. doi: 10.1099/jmm.0.049585-0
10. Stone B.L., Daly J., Srivastava R. Duration of *Bordetella pertussis* polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, 2014, vol. 3, no. 4, pp. 347–349. doi: 10.1093/jpids/piu004
11. Qin X. Resurgence of whooping cough and the role of laboratory diagnosis. *Clin. Microbiol. News Lett.*, 2015, vol. 37, no. 9, pp. 69–76.

12. Qin X., Galanakis E., Martin E.T., Englund J.A. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 506–511.
13. Rodgers L., Martin S.W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A., Mandal S., Salamon D., Leber A., Tondella M.L., Tatti K., Spicer K., Emanuel A., Koch E., McGlone L., Pawloski L., Lemaile-Williams M., Tucker N., Iyer R., Clark T.A., Diorio M. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* – Ohio, 2010–2011. *Clin. Infect. Dis.*, 2013, vol. 56, no. 3, pp. 322–331. doi:10.1093/cid/cis888
14. Van Amersfoort S.C., Schouls L.M., Van der Heide H.G., Advani A., Hallander H.O., Bondeson K., Von König C.H., Riffelmann M., Vahrenholz C., Guiso N., Caro V., Njamkepo E., He Q., Mertsola J., Mooi F.R. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 6, pp. 2837–2843.
15. World Health Organization. WHO-recommended surveillance standard of pertussis. URL: www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis_standards/en (07.10.2016)

Авторы:

Пименова А.С., младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Борисова О.Ю., д.м.н., доцент, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Цвиркун О.В., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории профилактики коклюша и кори ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Басов А.А., младший научный сотрудник лаборатории профилактики коклюша и кори ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Алешкин В.А., д.б.н., профессор, директор ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, зам. директора по биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Донских Е.Е., к.б.н., доцент, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Пикина А.П., ассистент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

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

Афанасьев М.С., д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Караулов А.В., академик РАН, профессор, д.м.н., зав. кафедрой клинической аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

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

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

Tsvircun O.V., PhD, MD (Medicine), Head Researcher of Laboratory of Whooping Cough and Measles, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Basov A.A., Junior Researcher, Laboratory of Whooping Cough and Measles, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

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

Afanasyev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Biotechnology Department, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Donskikh E.E., PhD (Biology), Associate Professor, Associate Professor of Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Pikina A.P., Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

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

Afanasyev M.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Allergology and Immunology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Karaulov A.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Allergology and Immunology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BORRELIA* И ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА КЛЕЩЕЙ, СОБРАННЫХ В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.А. Бессолицына¹, С.А. Волков¹, Ф.С. Столбова²

¹ Вятский государственный университет, г. Киров, Россия

² Вятская государственная сельскохозяйственная академия, г. Киров, Россия

Резюме. Клешевой энцефалит и клещевой боррелиоз (болезнь Лайма) — наиболее известные и распространенные трансмиссивные болезни человека. В настоящее время показано, что оба эти заболевания могут диагностироваться и у домашних животных. Векторами для их распространения выступают иксодовые клещи, широко распространенные на территории Российской Федерации. Чаще всего на предмет инфицирования исследуются только клещи, снятые с человека, что не дает полной картины по распределению возбудителей данных заболеваний в популяции клещей. Таким образом, возникает необходимость исследования клещей, собранных не только с человека. В рамках данного исследования проводилось определение наличия генетического материала вируса клещевого энцефалита, а также бактерий группы *Borrelia burgdorferi sensu lato*, в клещах, собранных в период 2007–2016 гг., с учетом их видовой и половой принадлежности, а также с учетом объекта, с которого клещ был снят. Определены основные виды клещей, являющиеся переносчиками возбудителей на территории Кировской области. Было показано независимое колебание частоты зараженности исследуемыми возбудителями у клещей разных видов. Кроме того, была обнаружена тенденция к постепенному росту зараженности клещей с течением времени. Чаще всего исследуются только самки клещей, так как они длительное время после укуса остаются на человеке или животных. В то же время было показано, что самцы клещей также могут являться переносчиками возбудителей, несмотря на кратковременный укус. Было установлено, что процент зараженности самцов со временем возрастает. Доля инфицированных самок также возрастает, что согласуется с общим ростом зараженности клещей. Были показаны колебания зараженности клещей разных видов. Колебания могут быть связаны с распространением на территории области клещей, не характерных для данной местности. Причины расширения ареала могут быть связаны с изменением климата. Различия зараженности клещей разных видов могут быть связаны с тем, что изучаются как виды обычные для Кировской области, так и виды, которые только проникают на данную местность. Также была изучена доля инфицированных клещей в зависимости от источника их сбора. Было показано, что наибольший процент зараженности имеют клещи, снятые с человека, а наименьший — снятые с травяного покрова.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, клещевой боррелиоз, *Borrelia burgdorferi s.l.*, иксодовые клещи, идентификация, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция.

Адрес для переписки:

Волков Станислав Александрович
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36,
ФГБОУ ВО Вятский государственный университет.
Тел.: 8 (922) 926-61-05 (моб.).
E-mail: volkov210691@mail.ru

Contacts:

Stanislav A. Volkov
610000, Russian Federation, Kirov, Moskovskaya str., 36,
Vyatka State University.
Phone: +7 (922) 926-61-05 (mobile).
E-mail: volkov210691@mail.ru

Библиографическое описание:

Бессолицына Е.А., Волков С.А., Столбова Ф.С. Динамика зараженности бактериями рода *Borrelia* и вирусом клещевого энцефалита клещей, собранных в Кировской области // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 171–180. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-171-180

Citation:

Bessolytsina E.A., Volkov S.A., Stolbova F.S. Dynamics of ticks' infestation with *Borrelia* genus bacteria and tick-borne encephalitis virus in Kirov region // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 171–180. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-171-180

DYNAMICS OF TICKS' INFESTATION WITH *BORRELIA* GENUS BACTERIA AND TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN KIROV REGION

Bessolitsyna E.A.^a, Volkov S.A.^a, Stolbova F.S.^b

^a Vyatka State University, Kirov, Russian Federation

^b Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russian Federation

Abstract. Tick-borne encephalitis and tick-borne borreliosis (or Lyme disease) are one of the most known and the most spread transmissible diseases of human. Nowadays it was proved that these diseases are diagnosed among domestic animals as well. Ixodida ticks are often serve as vectors for these diseases. It is common that only ticks gathered from human after bite are studied for presence of infection. But such approach does not give a full distribution picture of infection among the ticks. Thus, it is necessary to study ticks gathered not only from human but from other sources as well. The aim of this study is to determine the presence of TBEV and *Borrelia burgdorferi* sensu lato genetic material in ticks depending on its species, sexual identity and object it was gathered from in 2007–2016. The main tick vectors were determined. It was shown that percentage of infected with different diseases ticks fluctuates separately during the period of the study. It was also shown that percentage of infected ticks tends to increase. It is often that only tick female are studied as it stay for a long time after the bite. But it was proved that male ticks can also be a vector for diseases. It was proved that percentage of infected male ticks is increasing. The percentage of infected female ticks is also increasing along with general percentage of infected ticks. Fluctuations of percentage of infected ticks among different species was shown. Such fluctuation can be a sign tick's areal spreading at unusual territories. It can be related to climate change. The difference of percentage of infected ticks of different species can be related to the study of ticks usual for the area and ticks which migrate to the Kirov region. The percentage of infected ticks was also studied. It was also proved that the maximum percentage of infected ticks had the ones gathered from human and minimal percentage had the ones gathered from plants.

Key words: tick-borne encephalitis virus, tick-borne borreliosis (Lyme disease), *Borrelia burgdorferi* s.l., Ixodida ticks, identification, reverse transcription, polymerase chain reaction.

Введение

Клещевой энцефалит и клещевой боррелиоз — это наиболее известные и распространенные трансмиссивные заболевания человека, кроме того оба этих заболевания диагностируются и у домашних животных [8].

Клещевой энцефалит (tick borne encephalitis, TBE) — природно-очаговая вирусная инфекция, характеризующаяся лихорадкой, интоксикацией и поражением серого вещества головного мозга и/или оболочек головного и спинного мозга. Заболевание может привести к стойким неврологическим, психиатрическим осложнениям и летальному исходу [6].

Вирус клещевого энцефалита (ТБЕВ) — это нейротропный, РНК-содержащий вирус, который относится к роду *Flavivirus* и входит в семейство *Flaviviridae* экологической группы арбовирусов [6]. Данный возбудитель выявляется на территории от Западной Европы до Дальнего Востока [5].

Клещевой боррелиоз — это системное заболевание, характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений и часто имеющее хроническое и рецидивирующее течение. При боррелиозной инфекции поражаются кожные покровы, нервная и сердечно-сосудистая система, опорно-двигательный аппарат [3].

В настоящее время показано, что возбудители данного заболевания относятся к группе *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Данная группа бактерий включает в себя 18 геновидов [14]. Показано, что в Европе лишь некоторые из них являются патогенными для человека: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), а патогенность других видов не является полностью определенной [7]. Хотя все патогенные геновиды могут вызывать мигрирующую эритему, разные представители данной группы могут приводить к специфическим для них нарушениям в организме хозяина. *B. burgdorferi* s.s. чаще всего ассоциируется с артритом и поражениями нервной системы (нейроборрелиоз), *B. garinii* — с нейроборрелиозом, а *B. afzelii* — с хроническими поражениями кожи [14].

Экологически возбудители клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза тесно связаны с иксодовыми клещами и их прокормителями. Основным видом клещей, зараженных трансмиссивными заболеваниями в Европе, является вид *Ixodes ricinus*. Однако в Российской Федерации, в ее как европейской, так и азиатской частях, выявляется большое количество клещей вида *Ixodes persulcatus*, в которых также обнаруживается вирус клещевого энцефалита [9]. Кроме этих двух основных видов, в результате изменения климата, в южной

части Европы и европейской части Российской Федерации наблюдается рост количества клещей вида *Dermacentor reticulatus*, в организмах которых также обнаружен вирус клещевого энцефалита [2].

Еще одним важным вопросом является оценка зараженности клещей в зависимости от их пола. Считается, что инфекционные агенты передаются в организм человека при укусе самок. Но не исключено, что инфекция передается и при укусе самца, несмотря на то, что кратковременный укус самца чаще всего не детектируется, самцы также являются переносчиками трансмиссивных заболеваний [1].

В органах Роспотребнадзора на наличие возбудителей клещевого боррелиоза и клещевого энцефалита исследуют только клещей, снятых с человека, однако данные заболевания выявляются не только у человека, но и у домашних животных [8]; кроме того домашние животные тесно контактируют с человеком, и зараженный клещ может переместиться с животного на человека и при укусе стать причиной заболевания.

Таким образом, целью исследования являлось определение с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) генетического материала вируса клещевого энцефалита, а также ДНК бактерий группы *Borrelia burgdorferi* s.l. методом ПЦР, в клещах, собранных в период 2007–2016 гг., с учетом их видовой и половой принадлежности, а также с учетом объекта, с которого клещ был снят.

Материалы и методы

Сбор клещей, определение вида и половой принадлежности. Сбор клещей проводили с растительного покрова на движущегося учетчика и флаг или волокушу из вафельной ткани размером 60 × 100 см [4], а также вручную — с людей и домашних животных (собак, кошек).

Идентификацию клещей, выделенных из природных источников, проводили по определительным таблицам Н.А. Филипповой [4].

Выделение суммарных нуклеиновых кислот. Суммарные нуклеиновые кислоты (НК) экстрагировали с помощью гуанидинтиоизоцианатного метода [12] из клещей, фиксированных в 70% этиловом спирте.

*Анализ на наличие генетического материала бактерий группы *Borrelia burgdorferi* s.l.* Для амплификации использовали пару праймеров:

- 5S-23S spacer F 5'-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG-3';
- 5S-23S spacer R 5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA-3' [13].

Состав реакционной смеси для ПЦР: 0,5 мкл пробы (50 нг), однократный буфер для ПЦР без магния («Sybenzyme»), 1,5 mM MgCl₂, 200 мкмоль смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов («Sybenzyme»), прямой и обратный праймеры по 10 пмоль каждого («Syntol»), 1,25 ед. а. Таq-полимеразы («Sybenzyme»), вода до конечного объема 10 мкл.

Условия ПЦР: 1 цикл денатурации — 94°C, 5 мин; 40 циклов — 94°C, 30 с; 42°C, 30 с и 72°C, 30 с; 1 цикл достройки — 72°C, 5 мин.

Продукты амплификации разделяли в 6% нативном полиакриламидном геле, гель окрашивали бромистым этидием [12].

Достоверность различий оценивали с использованием двустороннего критерия Фишера [11] с уровнем значимости 0,05.

Анализ на наличие генетического материала вируса клещевого энцефалита. Исследование нуклеиновых кислот, выделенных из клещей, проводили с использованием обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Для проведения реакции обратной транскрипции был использован праймер: TBEV-R 5'-ctc-atg-ttc-agg-ccc-aac-ca-3' [10]

Для амплификации использовали следующие праймеры:

- TBEV-E(F) 5'-aca-ccg-gag-act-atg-ttg-ccg-ca-3';
- TBEV-E(R) 5'-ccg-ttg-gaa-ggt-gtt-ca-ct-3';
- TBEV-S(F) 5'-g(g/t)g-gat-gtg-tca-cga-tca-ct-3';
- TBEV-S(R) 5'-gc(c/t)-gt(c/t)-gga-agg-tgt-tcc-aga-3' [10].

Состав реакционной смеси для ПЦР: 0,5 мкл пробы (50 нг), однократный буфер для ПЦР без магния («Sybenzyme»), 3 mM MgCl₂, 200 мкмоль смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов («Sybenzyme»), прямой и обратный праймеры по 10 пмоль каждого («Syntol»), 1,25 ед. а. Таq-полимеразы («Sybenzyme»), вода до конечного объема 10 мкл.

Условия ПЦР: 1 цикл денатурации — 94°C, 5 мин; 40 циклов — 94°C, 30 с; 57°C, 30 с и 72°C, 30 с; 1 цикл достройки — 72°C, 5 мин.

Продукты амплификации разделяли в 6% нативном полиакриламидном геле, который окрашивали бромистым этидием [12].

Результаты

В период с 2007 по 2016 гг. было исследовано 1274 клеща из 26 районов Кировской области. Была определена видовая принадлежность исследованных клещей. В период с 2007 по 2016 гг. были исследованы клещи трех видов: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*. Было исследовано 983 клеща вида *Ixodes persulcatus*, 265 клеща — *Dermacentor reticulatus*

Таблица 1. Процент зараженности клещей в Кировской области вирусом клещевого энцефалита и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l., а также козараженности этими возбудителями в период с 2007 по 2016 гг.

Table 1. Percentage of ticks infected with TBEV and *Borrelia burgdorferi* s.l. microorganisms in Kirov region and coinfection with these causative agents in 2007–2016

Год Year	Суммарное количество клещей Total number of ticks	Боррелиоз, % Infected with Lyme disease, %	TBEV, % Infected with TBEV, %	Козараженность боррелиозом и TBEV, % Coinfestation with Lyme disease and TBEV, %
2007	28	35,7	7,1	3,6
2008	71	26,8	12,7	4,2
2009	92	23,9	8,7	2,2
2010	164	31,7	10,9	5,5
2011	155	30,9	17,4	9,7
2012	144	20,1	22,9	6,9
2013	59	20,3	8,5	1,7
2014	193	31,6	16,1	6,7
2015	208	42,3	20,7	11,1
2016	160	30,6	22,5	8,75

и 26 клещей вида *Ixodes ricinus*. Результат исследования зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l., а также козараженности обоими возбудителями в период с 2007 по 2016 гг., представлены в таблице 1.

В ходе исследования был также определен пол собранных клещей; за период с 2007 по 2016 гг. была исследована 1001 самка и 273 самца. Результаты исследования зараженности самцов и самок возбудителями представлены в таблице 2.

Также в ходе исследования был изучен процент одновременного заражения клещей различными возбудителями. Результаты исследования козараженности представлены в таблице 3.

Клещи были собраны с нескольких объектов: с растительного покрова — 151 клещ; с одежды человека — 214, с кошек — 145, с собак — 764. Все образцы клещей были проанализированы на предмет зараженности сибирской и европейской формами клещевого энцефалита. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Обсуждение

ПЦР-анализ зараженности клещей вирусом Tick-Borne Encephalitis и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l.

Зараженность вирусом определяли при исследовании суммарных нуклеиновых кислот, выделенных из каждого клеща, методом

ОТ-ПЦР. В реакции с праймерами TBEV-E(F) и TBEV-E(R) образуется фрагмент длиной 200 п.н., а в реакции с праймерами TBEV-S(F) и TBEV-S(R) длина ПЦР-продукта составляет 353 п.н. Праймеры подобраны для выявления двух изоформ (сибирской и европейской) вируса клещевого энцефалита; в данном анализе осуществляли суммирование клещей зараженных, сибирской и европейской изоформами, за исключением случаев, когда один клещ заражен обоими изоформами.

Зараженность бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l. определяли при исследовании суммарных нуклеиновых кислот методом ПЦР с использованием праймеров 5S-23S spacer F и 5S-23S spacer R, в результате выявляется фрагмент ДНК длиной 228 п.н.

Анализ зараженности клещей

В ходе исследования было показано, что процент зараженности бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l. несколько выше, чем вирусом клещевого энцефалита. Но для обоих возбудителей заболеваний наблюдается постепенный рост процента зараженности, а также его колебания в течении времени. В случае возбудителя клещевого боррелиоза первый пик процента зараженности наблюдается в самом начале исследований в 2007 г. (35,7%), следующий пик зараженности наблюдается в 2015 г. (42,3%). В случае клещевого энцефалита также наблюдается два основных пика: в 2012 (22,9%) и в 2016 (22,5%) гг., но, с учетом постепенного нарастания процента заражен-

Таблица 2. Процент зараженности самцов и самок клещей в Кировской области вирусом клещевого энцефалита и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l., а также козараженности этими возбудителями в период с 2007 по 2016 гг.

Table 2. Percentage of male and female ticks infected with TBEV and *Borrelia burgdorferi* s.l. microorganisms in Kirov region and coinfection with these causative agents in 2007–2016

Год Year	Пол Sexual identity	Суммарное количество клещей Total number of ticks	Боррелиоз, % Infected with Lyme disease, %	TBEV, % Infected with TBEV, %	Козараженность боррелиозом и TBEV, % Coinfection with Lyme disease and TBEV, %
2007	Самки Female	18	22,2	5,5	0
	Самцы Male	10	60	10	10
2008	Самки Female	58	29,3	15,5	5,2
	Самцы Male	13	15,4	0	0
2009	Самки Female	76	23,7	10,5	2,6
	Самцы Male	16	25	0	0
2010	Самки Female	114	32,5	12,3	6,1
	Самцы Male	50	30	8	4
2011	Самки Female	130	30,8	20,8	11,5
	Самцы Male	25	32	0	0
2012	Самки Female	107	19,6	22,4	8,4
	Самцы Male	37	21,6	24,3	2,7
2013	Самки Female	47	23,4	10,6	2,1
	Самцы Male	12	8,3	0	0
2014	Самки Female	154	27,9	16,9	6,5
	Самцы Male	39	46,1	12,8	7,7
2015	Самки Female	168	36,9	21,4	10,1
	Самцы Male	40	65	17,5	15
2016	Самки Female	129	24	20,9	7,7
	Самцы Male	31	58,1	29	12,9

Таблица 3. Процент зараженности клещей различных видов в Кировской области вирусом клещевого энцефалита и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l., а также козараженности этими возбудителями в период с 2007 по 2016 гг.

Table 3. Percentage of ticks of different species infected with TBEV and *Borrelia burgdorferi* s.l. microorganisms in Kirov region and coinfection with these causative agents in 2007–2016

Год Year	Вид Species	Суммарное количество клещей Total number of ticks	Боррелиоз, % Infected with Lyme disease, %	TBEV, % Infected with TBEV, %	Козараженность боррелиозом и TBEV, % Coinfection with Lyme disease and TBEV, %
2007	<i>I. persulcatus</i>	28	35,7	7,1	3,6
2008	<i>I. persulcatus</i>	71	26,8	12,8	4,2
2009	<i>I. persulcatus</i>	92	23,9	8,7	2,2
2010	<i>I. persulcatus</i>	102	33,3	11,8	4,9
	<i>D. reticulatus</i>	62	29	9,7	6,4
2011	<i>I. persulcatus</i>	137	33,6	19,7	10,9
	<i>D. reticulatus</i>	18	11,1	0	0
2012	<i>I. persulcatus</i>	110	20,9	30	5,4
	<i>D. reticulatus</i>	34	17,6	0	0
2013	<i>I. persulcatus</i>	40	15	10	2,5
	<i>D. reticulatus</i>	19	31,6	5,3	0
2014	<i>I. persulcatus</i>	89	10,1	5,6	0
	<i>I. ricinus</i>	26	38,5	26,9	0
	<i>D. reticulatus</i>	78	58,8	24,4	16,7
2015	<i>I. persulcatus</i>	179	40,2	22,1	10,6
	<i>D. reticulatus</i>	29	51,7	17,2	13,8
2016	<i>I. persulcatus</i>	134	30,6	21,6	8,9
	<i>D. reticulatus</i>	24	29,2	29,2	8,3

ности, можно выявить еще один пик в 2008 г. (12,7%). Пики зараженности бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l. имеют больший период, составляющий семь лет, тогда как возрастание зараженности клещей вирусом TBEV происходит с большей частотой: период между пиками составляет всего четыре года. Пики зараженности клещей возбудителями заболевания не совпадают, что позволяет говорить о том, что заражение каждым из исследуемых возбудителей происходит независимо. При исследовании процента козараженности клещей двумя возбудителями также наблюдаются колебания и два максимальных пика: в 2011 (9,7%) и 2015 (11,1%) гг. В данном случае явный период между пиками составляет четыре года, то есть наблюдается не только увеличение процента козараженности, но и увеличение частоты возникновения пиков. Нарастание частоты пиков козараженности можно связать с ростом общего процента зараженности каждым воз-

будителем по отдельности, однако динамика изменения козараженности также не зависит от динамики зараженности вирусом TBEV и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l. Это подтверждает предположение об отсутствии связей между заражением вирусом клещевого энцефалита и возбудителем клещевого боррелиоза.

Анализ половой принадлежности клещей

Считалось, что переносчиками трансмиссивных заболеваний являются только самки клещей. Это связано с тем, что укус самца кратковременный и его часто не замечают. Поэтому самцы клеща редко подвергаются исследованию медицинскими учреждениями на предмет их зараженности возбудителем клещевого энцефалита. Тем не менее, самцы также являются носителями трансмиссивных заболеваний [1]. В ходе исследования была проанализирована динамика зараженности

Таблица 4. Процент зараженности клещей, снятых с различных объектов Кировской области, вирусом клещевого энцефалита и бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l., а также козараженности этими возбудителями в период с 2007 по 2016 гг.

Table 4. Percentage of ticks gathered from different objects and infected with TBEV and *Borrelia burgdorferi* s.l. microorganisms in Kirov region and coinfection with these causative agents in 2007–2016

Объект сбора Source of tick	Суммарное количество клещей Total number of ticks	Боррелиоз, % Infected with Lyme disease, %	TBEV, % Infected with TBEV, %	Козараженность боррелиозом и TBEV, % Coinfestation with Lyme disease and TBEV, %
Кошка Cat	145	33,1	16,5	6,9
Собака Dog	764	28,4	16,4	6,4
Травяной покров Vegetation cover	151	20,5	9,3	2
Одежда человека Human clothes	214	43,9	22,4	12,6

самцов и самок, собранных в Кировской области за период исследования, результаты представлены в таблице 2.

В целом количество исследованных самцов меньше, чем самок, это связано и их размерами и кратковременностью укуса. Анализ зараженности клещей бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l. показал, что в 2007 г. и в период с 2014 по 2016 гг. процент зараженности самцов выше, чем процент зараженности самок. Расчет χ^2 показал, что различия между процентами зараженности статистически достоверны. Значение χ^2 для 2007 г. составило 4, для 2014 — 4,79, для 2015 — 10,26, для 2016 — 13,63. Следует отметить, что годы, в которые наблюдается преобладание зараженных самцов, совпадают с общим возрастанием процента зараженности (табл. 1). В период с 2008 по 2013 гг. достоверных различий процентов зараженности самцов и самок не наблюдается. Изучение зараженности самцов и самок клещей вирусом клещевого энцефалита показало, что процент зараженности либо сопоставим, либо процент зараженных самок незначительно выше, но эти различия статистически не достоверны. Исключение составляют результаты анализа в 2011 г., когда процент зараженности самок также был выше, но различия статистически достоверны (значение χ^2 6,29)

Козараженность самцов обоими видами возбудителей была выше в 2007 г. и в период с 2014 по 2016 гг., то есть совпадает с пиками зараженности самцов возбудителем клещевого боррелиоза, однако статистической достоверности между процентами козараженности самцов и самок не наблюдается.

Анализ видовой принадлежности клещей

Исследования зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита в странах Европы показало, что носителями данного вируса могут быть клещи 14 видов. В Кировской области были собраны клещи, относящиеся к трем разным видам и был проведен анализ процента зараженности этих клещей в зависимости от видовой принадлежности, результаты представлены в таблице 3.

За период исследований были выявлены клещи трех видов: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*. *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* выявляются в странах Европы и в Российской Федерации. Клещи данных видов обычны для Кировской области, но вид *Ixodes ricinus* чаще встречается в Западной и Северной Европе, а в Кировской области более распространен вид *Ixodes persulcatus*, который характерен для Евразии и Российской Федерации [9]. В период с 2007 по 2009 гг. в Кировской области были выявлены только клещи вида *Ixodes persulcatus*, поэтому не представляется возможным оценить связь между процентом зараженности и видовой принадлежностью клеща-носителя. Но с 2010 г. в Кировской области выявлялись клещи двух видов: *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*. Клещи вида *Dermacentor reticulatus* выявляются в основном значительно южнее Кировской области, однако изменение погодных условий, связанное с потеплением климата, могло стать причиной расширения ареала *Dermacentor reticulatus* на север и стать причиной их обнаружения в Кировской области [2]. В 2014 г. также были обнаружены клещи вида *Ixodes ricinus*.

Анализ зараженности клещей видов *Dermacentor reticulatus* и *Ixodes persulcatus* бактериями *Borrelia burgdorferi* s.l. показал, что в обоих видах клещей выявляются бактерии этой группы. В 2010 г. процент зараженности возбудителями боррелиоза у клещей вида *Ixodes persulcatus* выше, чем у вида *Dermacentor reticulatus*, но различия статистически недостоверны. В 2011 г. также наблюдается более низкий процент зараженности клещей вида *Dermacentor reticulatus*, но различия уже статистически достоверны (значение χ^2 4,57). В 2012 и 2013 гг. достоверные различия отсутствуют, но в 2013 г. процент зараженности клещей вида *Dermacentor reticulatus* выше, чем вида *Ixodes persulcatus*. В 2014 г. процент зараженности бактериями *Borrelia burgdorferi* s.l. клещей вида *Dermacentor reticulatus* также выше, чем клещей вида *Ixodes persulcatus*, причем эти различия статистически достоверны (значение χ^2 37,48). В этот же год были проанализированы клещи вида *Ixodes ricinus*. Процент зараженности клещей вида *Ixodes ricinus* возбудителями клещевого боррелиоза сопоставим с процентом зараженности клещей вида *Dermacentor reticulatus* (значение χ^2 1,85), и статистически достоверно различается с зараженностью клещей вида *Ixodes persulcatus* (значение χ^2 1,73). Клещи видов *Dermacentor reticulatus* и *Ixodes ricinus* являются нетипичными для Кировской области, что может объяснять разницу в проценте зараженности между видом, обычным в данной местности, и видами, которые только проникают в Кировскую область.

Анализ зараженности клещей разных видов ТБЕВ показывает, что клещи вида *Ixodes persulcatus* имеют больший процент зараженности в период с 2010 по 2013 гг., но только в 2011 и 2012 гг. эти различия статистически достоверны (значения χ^2 4,3 и 13,23 соответственно). В 2014 г. процент зараженности клещей вида *Dermacentor reticulatus* больше, чем вида *Ixodes persulcatus*, причем различия статистически достоверны (значение χ^2 11,86). Аналогичная ситуация наблюдается по результатам изучения процента зараженности клещей видов *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*. Процент зараженности ТБЕВ клещей вида *Ixodes ricinus* выше, чем вида *Ixodes persulcatus*, и различия также статистически достоверны (значение χ^2 9,77). Затем в 2015 и 2016 гг. процент зараженности клещей разных видов вновь стал сопоставим.

Изучение процента козараженности возбудителями клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза показало, что в период с 2010 по 2013 гг. процент зараженности клещей вида *Ixodes persulcatus* выше, чем клещей

вида *Dermacentor reticulatus*, но эти различия статистически недостоверны. В 2014 г. наблюдаются статистически достоверные различия процента зараженности вирусом клещевого энцефалита между клещами видов *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus* (значение χ^2 16,09), причем процент козараженности клещей вида *Dermacentor reticulatus* выше, чем вида *Ixodes persulcatus*. При этом проценты козараженности клещей видов *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus* равны нулю и, как следствие, статистически не различаются. Такие различия процента зараженности клещей разных видов можно объяснить тем, что виды, чей процент зараженности различается со статистической достоверностью, являются нетипичными для данной области. Наблюдается проникновение этих видов на новую территорию и, как следствие, заражение новых видов трансмиссивными заболеваниями через животных-хозяев.

Анализ клещей из различных источников

В медицинских учреждениях и органах Роспотребнадзора анализируются только клещи, снятые с человека в момент укуса, это позволяет определить зараженность клеща и провести профилактические мероприятия, но для более полной эпидемиологической картины зараженности трансмиссивными заболеваниями, в том числе и клещевым энцефалитом, необходимо изучить процент зараженности клещей, снятых с других объектов: домашних животных, которые могут контактировать с человеком, а также с травяного покрова. Поэтому в рамках данной работы исследовались клещи, снятые с одежды человека, собак, кошек и травяного покрова. Результаты представлены в таблице 4.

Процент зараженности бактериями группы *Borrelia burgdorferi* s.l. клещей, собранных с собак и кошек, сопоставим. При этом он отличается от процента зараженности клещей, собранных с одежды человека. Процент зараженности возбудителем клещевого энцефалита клещей, собранных с одежды человека, выше, чем клещей, собранных с собак и кошек, причем различия статистически достоверны (значения χ^2 18,57 и 4,23 соответственно). Кроме того, клещи, собранные с травяного покрова, имеют меньший процент зараженности, чем клещи, собранные с одежды человека, кошек и собак (значения χ^2 21,52; 5,98 и 3,96 соответственно).

Анализ зараженности клещей, снятых с различных объектов, вирусом ТБЕВ показал, что наибольший процент клещей, зараженных

вирусом клещевого энцефалита, характерен для клещей, снятых с одежды человека. Клещи, снятые с собак и кошек, имеют меньший процент зараженности ТВЕV, чем клещи, снятые с человека, при этом процент зараженности клещей, снятых с человека и с собак имеют статистически достоверные различия (значение χ^2 4,23). Тогда как зараженность клещей, снятых человека и с кошек, статистически не различаются. Наименьший процент зараженности вирусом клещевого энцефалита выявлен у клещей, снятых с травяного покрова, причем процент зараженности этих клещей статистически достоверно отличается от процента зараженности ТВЕV клещей, собранных с одежды человека и с собак (значения χ^2 10,87 и 4,92 соответственно). При этом процент зараженности клещей возбудителями клещевого энцефалита, снятых с кошек, выше, чем клещей, снятых с травяного покрова, но эти различия статистически недостоверны.

Сходная ситуация наблюдается и с процентом козараженности обоими возбудителями. Процент козараженности клещей, снятых с собак и кошек, сопоставимы. Однако клещи, снятые с травяного покрова, имеют наименьший процент козараженности, причем различия процента козараженности клещей, снятых с кошек и травяного покрова и с собак и травяного покрова, имеют статистически достоверные различия (значения χ^2 4,25 и 4,61 соответ-

ственно). Наибольший процент козараженности наблюдается у клещей, снятых с человека. Но при этом статистически достоверные различия наблюдаются при сравнении процента козараженности клещей, снятых с собак и травяного покрова (значения χ^2 8,98 и 13,26 соответственно). При этом проценты козараженности клещей, снятых с человека и с кошек сопоставимы и статистически достоверных различий на имеют.

Выводы

Таким образом, трансмиссивные заболевания опасны как для человека, так и для домашних животных [8]. Кроме того, кошки и собаки тесно контактируют с человеком, и не удаленный вовремя клещ может переместиться с животного на человека и стать причиной заболевания в результате уже следующего укуса другого хозяина. Именно поэтому необходим анализ зараженности клещей, снятых не только с человека, но и с домашних животных, тесно контактирующих с человеком.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность заведующей ветеринарной лечебницей Беяевой Татьяне Анатольевне и ветеринарному врачу Хмелининой Нине Андреевне.

Список литературы/References

1. Бессолицына Е.А., Бердинских И.С., Столбова Ф.С., Дармов И.В. Анализ зараженности бактериями рода *Borrelia* клещей на территории Кировской области // Российский паразитологический журнал. 2012. № 4. С. 41–46. [Bessolitsyna E.A., Berdinskikh I.S., Stolbova F.S., Darmov I.A. The analysis of contamination by bacteria of genus *Borrelia* ticks in Kirov area. *Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*, 2012, no. 4, pp. 41–46. (In Russ.)]
2. Волков С.А., Бессолицына Е.А., Столбова Ф.С., Дармов И.В. Анализ инфицированности клещей видов *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus* трансмиссивными заболеваниями на территории Кировской области // Инфекция и иммунитет. 2016, Т. 6, № 2. С. 173–178. [Volkov S.A., Bessolytsina E.A., Stolbova F.S., Darmov I.V. Analysis of ticks of *Ixodes persulcatus* and *Dermacentor reticulatus* species with transmissible diseases in Kirov region. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 173–178. doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-173-178 (In Russ.)]
3. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма): пособие для врачей. Кольцово, 2005. 85 с. [Manzenyuk I.N., Manzenyuk O.Yu. Kleshchevye borreliozy (bolezni' Laima): posobie dlya vrachei [Lyme borreliosis (Lyme disease): manual for physicians]. *Koltsovo*, 2005. 85 p.]
4. Филиппова Н.А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acraea, Ixodidae): морфология, систематика, экология, медицинское значение. Л.: Наука, 1985. 416 с. [Filippova N.A. Taiga tick *Ixodes persulcatus* Schulze (Acraea, Ixodidae): morphology, systematics, ecology, medical importance [Taezhnyi kleshch *Ixodes persulcatus* Schulze (Acraea, Ixodidae): morfologiya, sistematika, ekologiya, meditsinskoe znachenie]. *Leningrad: Nauka*, 1985. 416 p.]
5. Gunther G., Haglund M. Tick-borne encephalopathies: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *CNS Drugs*, 2005, vol. 19, no. 12, pp. 1009–1032. doi: 10.2165/00023210-200519120-00004
6. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 2008, vol. 371, no. 9627, pp. 1861–1871. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4
7. Margos G., Vollmer S.A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 16, pp. 5410–5416. doi: 10.1128/AEM.00116-09
8. Pfeffer M., Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs — is this an issue? *Parasites & Vectors*, 2011, vol. 4, no. 1: 59. doi: 10.1186/1756-3305-4-59

9. Randolph S.E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, 2004, vol. 129, iss. S1, pp. S37–S65. doi: 10.1017/S0031182004004925
10. Ruzek D., Stastna H., Kopecky J., Golovljova I., Grubhoffer L. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *J. Virol. Meth.*, 2007, vol. 144, pp. 133–137.
11. Sahai H., Anwer Khurshid H. On analysis of epidemiological data involving A 2X2 contingency table: an overview of fisher's exact test and yates' correction for continuity. *J. Biopharm. Stat.*, 1995, vol. 1, no. 1, pp. 43–70. doi: 10.1080/10543409508835098
12. Sambrook J., Fritch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1626 p.
13. Schouls L.M., Van De Pol I., Rijpkema S.G., Schot C.S. Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, no. 7, pp. 2215–2222.
14. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme Borrelia complex — clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 4, pp. 487–493. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x

Авторы:

Бессолицына Е.А., к.б.н., доцент кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, г. Киров, Россия;

Волков С.А., аспирант кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, г. Киров, Россия;

Столбова Ф.С., к.б.н., доцент кафедры экологии и пчеловодства биологического факультета Вятской государственной сельскохозяйственной академии, г. Киров, Россия.

Authors:

Bessolytsina E.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Biological Faculty, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Volkov S.A., PhD Student, Department of Microbiology, Biological Faculty, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Stolbova F.S., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Ecology and Beekeeping, Biological Faculty, Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.03.2017
Отправлена на доработку 10.03.2017
Принята к печати 03.04.2017

Received 07.03.2017
Revision received 10.03.2017
Accepted 03.04.2017

КАРБАПЕНЕМАЗА-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ В СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОМ СТАЦИОНАРЕ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

А.Г. Полищук, Е.И. Якубович, О.В. Полухина, В.В. Осовских, В.И. Евтушенко

ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Охарактеризованы видовой состав, чувствительность к антимикробным препаратам, частота встречаемости и типы карбапенемаз карбапенемаза-продуцирующих грамотрицательных бактерий, выделенных в ФГБУ «РНЦРХТ» МЗ РФ с февраля 2014 г. по апрель 2016 г. Скрининг карбапенем-резистентных бактерий проводился путем посева биоматериала на хромогенные среды (CHROMagar KPC, DRG, Франция), а их видовая идентификация — методом матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе VITEK MS (bioMérieux, Франция). Чувствительность грамотрицательных бактерий к антимикробным препаратам определялась на анализаторе VITEK-2 (bioMérieux, Франция). Полученные результаты интерпретировались в соответствии с критериями EUCAST v. 6.0, 2016. Гены, кодирующие карбапенемазы групп KPC, OXA-48/162, VIM, IMP, NDM, OXA-51, OXA40/24, OXA-23 и OXA-58 выявлялись методом мультиплексной ПЦР в реальном времени (АмплиСенс, Россия). Выделено 813 клинически значимых штаммов бактерий (602 пациента), в том числе 405 грамотрицательных, среди которых 5,1% (21 штамм от 16 пациентов) нечувствительных к меропенему и/или имипенему: *Klebsiella pneumoniae* (n = 5), *Enterobacter cloacae* (n = 2), *Serratia marcescens* (n = 1), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3), *Acinetobacter baumannii* (n = 10). Из клинического материала 4-х пациентов одновременно выделено до 3-х штаммов разных видов нечувствительных к карбапенемам бактерий. У 84% нечувствительных к карбапенемам изолятов обнаружены гены, кодирующие приобретенные карбапенемазы: у *A. baumannii* — OXA40/24 (n = 8); у *K. pneumoniae* — OXA-48 (n = 1), KPC (n = 1) и NDM (n = 2); у *P. aeruginosa* — VIM (n = 1) и KPC (n = 1); у *E. cloacae* — KPC (n = 1). OXA-48 карбапенемаза обнаружена также в одном карбапенем-чувствительном штамме *K. pneumoniae*. Все карбапенемаза-продуцирующие штаммы имели фенотип множественной резистентности к антимикробным препаратам. Результаты исследования показали, что хотя доля карбапенем-нечувствительных штаммов среди грамотрицательных бактерий сравнительно невелика, все они обладают множественной устойчивостью к антимикробным препаратам и в большинстве из них обнаружены гены приобретенных карбапенемаз. Видовой состав и типы обнаруженных приобретенных карбапенемаз характерны для территории России. У *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* не выявлено превалирования какого-либо одного типа карбапенемаз, в то время как у всех штаммов *A. baumannii* обнаружен ген OXA40/24 карбапенемазы.

Ключевые слова: карбапенемазы, чувствительность бактерий, грамотрицательные бактерии, MALDI-TOF MS, видовая идентификация, нозокомиальные инфекции.

Адрес для переписки:

Полищук Анна Генриховна
197758, Россия, Санкт-Петербург, п. Песочный,
ул. Ленинградская, 70, ФГБУ Российский научный центр
радиологии и хирургических технологий.
Тел.: 8 921 587-77-62 (моб.).
E-mail: apolishchuk@rrcrst.ru

Contacts:

Anna G. Polischouk
197758, Russian Federation, St. Petersburg, Pesochnyi village,
Leningradskaya str., 70, Russian Research Centre of Radiology
and Surgical Technologies.
Phone: +7 921 587-77-62 (mobile).
E-mail: apolishchuk@rrcrst.ru

Библиографическое описание:

Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В., Осовских В.В.,
Евтушенко В.И. Карбапенемаза-продуцирующие грамотрицательные
бактерии в специализированном стационаре Санкт-Петербурга //
Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 181–192. doi: 10.15789/2220-
7619-2017-2-181-192

Citation:

Polischouk A.G., Jakubovich E.I., Poluhina O.V., Osovskich V.V.,
Evtushenko V.I. Carbapenemase-producing gram-negative bacteria
in a specialized hospital of St. Petersburg // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 181–192.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-181-192

CARBAPENEMASE-PRODUCING GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN A SPECIALIZED HOSPITAL OF ST. PETERSBURG

Polishchouk A.G., Jakubovich E.I., Poluhina O.V., Osovskich V.V., Evtushenko V.I.

Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Species composition, susceptibility to antimicrobial agents, incidence and type of carbapenemase of carbapenemase-producing gram-negative bacteria, isolated in the Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies from February 2014 to April 2016 were described. Screening of carbapenem-resistant bacteria was conducted by plating biomaterial on the chromogenic medium ("CHROMagar KPC", DRG, France), species identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) on the analyzer VITEK MS (bioMérieux, France). The sensitivity of gram-negative bacteria to antimicrobial drugs was determined on the analyzer VITEK-2 (bioMérieux), and the obtained results were interpreted in accordance with EUCAST criteria v.6.0, 2016. Genes encoding carbapenemase of KPC, OXA-48/162, VIM, IMP, NDM, OXA-51, OXA40/24, OXA-23 and OXA-58 groups were detected by multiplex real-time PCR (AmpliSens, Russia). 813 clinically relevant bacteria (602 patients) were obtained, including 405 gram-negative, among which 5.2% (21 strain from 16 patients) non-susceptible to meropenem and/or imipenem: *Klebsiella pneumoniae* (n = 5), *Enterobacter cloacae* (n = 2), *Serratia marcescens* (n = 1), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3), *Acinetobacter baumannii* (n = 10). Clinical material from 4 patients was infected by up to 3 carbapenem-non-susceptible strains of different species of gram-negative bacteria at the same time. The genes encoding acquired carbapenemases were detected in 84% of the nonsusceptible to carbapenems isolates: in *A. baumannii* — OXA40/24 (n = 8); in *K. pneumoniae* — OXA-48 (n = 1), KPC (n = 1) and NDM (n = 2); in *P. aeruginosa* — VIM (n = 1) and KPC (n = 1); in *E. cloacae* — KPC (n = 1). OXA-48 carbapenemase was also detected in one carbapenem-sensitive strain of *K. pneumoniae*. All carbapenemase-producing strains had a phenotype of multidrug resistance. The results of the study showed that over the analyzed period, the prevalence of the carbapenem-nonsusceptible strains of gram-negative bacteria were relatively low, but all these strains were multidrug resistant and most of them possessed acquired carbapenemase genes. The species carbapenem-nonsusceptible gram-negative bacteria and the types of the detected acquired carbapenemase were typical for Russia. For *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* no predominance of any one type of carbapenemase was revealed, while in all strains of *A. baumannii* the gene of OXA40/24 carbapenemase was found.

Key words: carbapenemases, bacterial sensitivity, gram-negative bacteria, MALDI-TOF MS, species identification, nosocomial infections.

Введение

Карбапенемы являются препаратами выбора при лечении ряда серьезных госпитальных инфекций, вызванных мультирезистентными штаммами грамотрицательных бактерий (ГОб). Среди ГОб наиболее частыми возбудителями госпитальных инфекций являются представители семейства *Enterobacteriaceae*, прежде всего *Klebsiella pneumoniae*, и неферментирующие ГОб — *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* [14].

Карбапенемы относятся к бета-лактамам антимикробным препаратам (АМП) и обладают наиболее широким спектром действия среди АМП этой группы. Устойчивость к бета-лактамам АМП может быть обусловлена уменьшенной проницаемостью бактериальной мембраны, активацией систем эффлюкса и экспрессией бактериальных ферментов бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, то есть карбапенемазы [8, 17]. Гены, кодирующие приобретенные карбапенемазы, большей частью локализованы на мобильных генетических элементах генома бактерий, что является

причиной их быстрого внутри- и межвидового распространения. В связи с этим, карбапенемаза-опосредованные механизмы устойчивости потенциально связаны с высоким риском возникновения вспышек госпитальных инфекций. В составе мобильных элементов часто присутствуют генные кассеты, несущие детерминанты устойчивости к АМП других классов, поэтому наличие у ГОб генов карбапенемазы обычно связано с фенотипами множественной резистентности (MDR — multidrug resistant), экстремальной резистентности (XDR — extensively drug-resistant) или панрезистентности (PDR — pandrug-resistant) к АМП [19, 20]. Наиболее эффективными с точки зрения уровня карбапенемазной активности и глобального распространения являются карбапенемазы групп KPC, VIM, IMP, NDM и OXA-48 [22, 24].

Начиная с 90-х гг. прошлого века, ГОб с карбапенемазной активностью быстро распространились по всему миру и на настоящий момент представляют одну из наиболее значимых угроз мировому здравоохранению [1, 14, 22]. В этом аспекте Россия и страны ближнего зарубежья не являются исключением.

По данным исследования МАРАФОН, все госпитальные штаммы *A. baumannii*, полученные от пациентов 18 стационаров России к 2012 г., оказались нечувствительны к имипенему, в то время как в 2008 г. только 5% выделенных штаммов *A. baumannii* были нечувствительны к этому карбапенему [3, 6]. У половины нечувствительных к имипенему изолятов *A. baumannii*, выделенных к 2012 г., были обнаружены карбапенемазы, в основном ОХА-40/24 типа. Большинство карбапенемаза-продуцирующих изолятов обладали MDR и XDR фенотипом (94 и 87% соответственно), а 1,2% из них (3 изолята) PDR фенотипом. Доля нечувствительных к имипенему и меропенему изолятов *P. aeruginosa* в 2012 г. также была высока: 88 и 67% соответственно. Среди нечувствительных к карбапенемам (КНЧ) изолятов *P. aeruginosa* больше половины обладали XDR фенотипом, а 0,3% (10 изолятов) PDR фенотипом. У 28% КНЧ штаммов был обнаружен ген карбапенемазы VIM типа [7]. Из выделенных в ходе исследования МАРАФОН (2012 г.) штаммов *K. pneumoniae* 22, 15 и 5% были нечувствительны к эртапенему, имипенему и меропенему соответственно [5]. О значительно большей доле КНЧ штаммов *K. pneumoniae* сообщалось в московском исследовании 2013–2014 гг., где соответствующие цифры были 68, 65 и 44% [16]. Хотя доля карбапенемаза-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* была различна — 7% в исследовании МАРАФОН и 55% в московском исследовании — в обоих исследованиях основной обнаруженной карбапенемазой была ОХА-48. Все карбапенемаза-продуцирующие штаммы в обоих исследованиях обладали MDR фенотипом.

Из других госпитальных ГОБ на территории России зафиксировано появление КНЧ штаммов *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* и *Proteus mirabilis*. Хотя их доля среди КНЧ ГОБ была сравнительно невелика в 2012 г., некоторые из выделенных штаммов обладали PDR фенотипом.

Исследования эпидемиологической ситуации по резистентности ГОБ к карбапенемам в Санкт-Петербурге за 2012–2014 гг. показали распространение в стационарах города КНЧ штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген карбапенемазы NDM-1. У 98% КНЧ штаммов *K. pneumoniae*, полученных от пациентов Санкт-Петербурга к началу 2013 г. был обнаружен ген карбапенемазы NDM-1 [2, 9, 10]. Наличие данной карбапенемазы у бактерий представляет особую опасность, поскольку, такие бактерии обычно резистентны почти ко всем используемым в клинике АМП, за исключе-

нием тигециклина и колистина [22]. В стационарах Санкт-Петербурга отмечен также рост частоты выделения карбапенем-резистентных (КР) штаммов *A. baumannii*. Согласно одному исследованию, объединившему 5 стационаров города, к 2014 г. совокупная доля госпитальных изолятов *A. baumannii*, резистентных хотя бы к одному карбапенему, приблизилась к 50%, при этом доля КР изолятов варьировала в зависимости от стационара от 2,5 до 62% [4]. Данные о количестве карбапенемаза-продуцирующих штаммов *A. baumannii* в этом исследовании отсутствуют.

Особая эпидемиологическая опасность, которую представляют ГОБ, синтезирующие карбапенемазы, определяет необходимость их раннего выявления на основе постоянного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей инфекций у госпитализированных пациентов.

Целью данного исследования было определение частоты встречаемости, профиля чувствительности к АМП и типов карбапенемаз карбапенемаза-продуцирующих ГОБ у пациентов ФГБУ «РНЦРХТ» МЗ РФ.

Материалы и методы

Изоляты ГОБ, нечувствительные к карбапенемам, были получены из клинического материала пациентов ФГБУ «РНЦРХТ» в период с февраля 2014 г. по апрель 2016 г.

Бактериальные изоляты. Посев клинического материала проводили в течение 2 ч после забора.

Для обнаружения ГОБ в крови и других в норме стерильных жидкостях использовали автоматический анализатор ВаСТ/ALERT (bioMérieux, Франция) и флаконы со средой и активированным углем для выделения аэробных и анаэробных гемокультур ВаСТ/ALERT FA и FN. Для обнаружения ГОБ в пробах мочи посев проводили по методу Голда, используя питательный агар с 5% бараньей кровью (Sredoff, Россия) и хромогенную неселективную среду «Уриселект агар» (Bio-Rad, Франция). Пробы с отделяемым ран и нижних дыхательных путей дополнительно засеивали на агар Шедлера (bioMérieux, Франция). Исследование микробной обсемененности фрагментов венозных катетеров проводили количественным методом, предложенным Brun-Buisson с нашей модификацией (Рацпредложение «Способ количественной оценки бактериальной обсемененности венозного катетера», рег. № 12947/8 от 29.11.2011 г.). Смывы с фрагментов катетеров высевали на 5% кровяной агар и «Уриселект

Таблица 1. Клинические характеристики пациентов с карбапенемаза-продуцирующими грамотрицательными бактериями

Table 1. Clinical characteristics of patients with carbapenemase-producing gram-negative bacteria

№ пациента Patient no.	Возраст Age	Пол Sex	Место жительства Place of residence	Основной диагноз Main diagnosis	Нахождение в стационаре Length of stay in the hospital		Количество внутриполостных операций до получения изолята Number of surgeries before isolation of bacteria
					всего дней total days	по отделениям by wards	
2014							
1	38	М M	Санкт-Петербург St. Petersburg	Цирроз печени Hepatocirrhosis	39	ОРИТ/Хирург RICU/Surgical	2
2015							
2	75	М M	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак ободочной кишки Colon cancer	82	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	2
3	38	Ж F	НД ND	Рак почки Kidney cancer	50	Уролог/ОРИТ Urological/RICU	НД ND
4	87	М M	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак мочевого пузыря Bladder cancer	26	Уролог/ОРИТ Urological/RICU	2
5	57	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Цирроз печени Hepatocirrhosis	16	ОРИТ RICU	2
6	51	М M	НД ND	НД ND	НД ND	Хирург Surgical	НД ND
7	70	М M	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак предстательной железы Prostate cancer	43	ОРИТ/Уролог RICU/Urological	1
8	65	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	30	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	1
9	83	М M	Санкт-Петербург St. Petersburg	Атеросклероз аорты Atherosclerosis of aorta	97	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	3
10	78	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	71	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	3
11	52	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак сигмовидной кишки Sigmoid colon cancer	7	Сосудистая хирургия Vascular surgery	1
12	61	М M	Тверская обл. Tver region	Рак мочевого пузыря Bladder cancer	18	Уролог/ОРИТ Urological/RICU	1
13	61	М M	Мурманск Murmansk	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	41	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	4
14	77	Ж F	Ленинградская обл. Leningrad region	Эхинококкоз печени Liver echinococcosis	43	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	3
15	67	М M	НД ND	Рак мочевого пузыря Bladder cancer	59	ОРИТ RICU	3
2016							
16	62	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Цирроз печени Hepatocirrhosis	76	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	5
17	67	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	45	Хирург/ОРИТ Surgical/RICU	2
18	46	Ж F	Санкт-Петербург St. Petersburg	Рак мочевого пузыря Bladder cancer	40	ОРИТ/Уролог RICU/Urological	1

Примечания. ОРИТ — отделение реанимации и интенсивной терапии; Уролог — урологическое; Хирург — хирургическое; НД — нет данных.

Notes. RICU — Reanimation and Intensive Care Unit; ND — no data.

агар». Посевы инкубировали от 24 до 72 ч. Посевы на хромогенных средах инкубировали при 35°C. Посевы на агаре Шедлера термостатировали в анаэробе.

Клинически значимыми считали все случаи выделения микроорганизмов из проб крови, при посеве смывов с фрагментов катетеров — в концентрации 10^3 КОЕ/мл и более, проб раневого отделяемого — 10^5 КОЕ/мл, мокроты и аспирата трахеобронхиального дерева — 10^6 КОЕ/мл, бронхоальвеолярной жидкости — 10^4 КОЕ/мл. Клиническую значимость возбудителей, выделенных из мочи, оценивали в соответствии с критериями диагностики ИМП по рекомендациям IDSA/ESCMID от 2007 г.

Видовая идентификация. Видовая идентификация микроорганизмов проводилась методом матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе VITEK MS, с использованием базы белковых спектров клинически значимых видов микроорганизмов и программы «Расширенный классификатор спектров» (bioMérieux, Франция).

Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Для обнаружения ГОБ, резистентных к карбапенемам, при первичном посеве клинического материала использовали среду «CHROMagar KPC» (DRG, Франция). Определение чувствительности ГОБ к антимикробным препаратам (АМП) проводили автоматизированным методом с помощью анализатора VITEK 2 и карт, предназначенных для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) АМП, актуальных для ГОБ — GNS-101 и 102 (bioMérieux, Франция). При необходимости проводили дополнительные исследования с помощью E-тестов на агаре Мюллера-Хинтона (bioMérieux, Франция). Полученные МИК интерпретировались в соответствии с критериями, установленными в 2016 г. Европейским комитетом по определению чувствительности микроорганизмов к АМП (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing — EUCAST) [25]. При определении чувствительности бактерий к АМП на анализаторе VITEK 2, использовалась экспертная программа Advanced Expert System (AES), способная предположить механизм устойчивости микроорганизмов к АМП. AES использует базу данных, состоящую из более чем 2000 фенотипов антимикробной резистентности различных патогенных микроорганизмов.

ПЦР детекция генов, кодирующих карбапенемазы. Гены карбапенемазы выявлялись методом

мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL», «АмплиСенс® MDR Ab-OXA-FL», и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (Интерлабсервис, Москва). Выявлялись гены, кодирующие приобретенные сериновые карбапенемазы групп KPC и OXA-48-подобных (OXA-48 и OXA-162), OXA-карбапенемаз ацинетобактеров групп OXA-23-, OXA-58-, OXA-40/24-подобных и видоспецифичные карбапенемазы *A. baumannii* (OXA-51-подобные) и металло-бета-лактамазы с карбапенемазной активностью групп VIM, IMP и NDM.

Результаты

С февраля 2014 г. по апрель 2016 г. из клинического материала 602 пациентов ФГБУ «РНЦРХТ» было выделено 813 клинически значимых штаммов бактерий, среди которых 405 ГОБ, среди которых в свою очередь 68,6% было представлено штаммами *Escherichia coli* (21,8%), *K. pneumoniae* (17%), *E. cloacae* (7,1%), *P. aeruginosa* (12,6%) и *A. baumannii* (10,1%). При первичном посеве клинического материала на селективную среду для отбора ГОБ, нечувствительных к карбапенемам (КНЧ), получено 23 штамма КНЧ ГОБ от 18 пациентов.

Пациенты. Из 18 пациентов, 12 проходили хирургическое лечение по поводу метастатических форм рака, 3-м пациентам с циррозом печени была проведена трансплантация печени, один пациент находился в стационаре с диагнозом эхинококкоз печени и один с атеросклерозом аорты (табл. 1).

Все пациенты перенесли внутриполостные операции в период их нахождения в ФГБУ «РНЦРХТ», причем в большинстве случаев более одной до момента получения КНЧ изолята. Период нахождения пациентов в стационаре варьировал от 7 до 97 дней, в течение которого большинство из них перемещалось между отделением реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и другими отделениями стационара (рис. 1). Пациенты № 5 и № 15 находились только в ОРИТ, а пациент № 11 только в отделении сосудистой хирургии. КНЧ изоляты были получены во время пребывания пациентов в ОРИТ (пациенты № 1–5, 9–10, 13–15), отделении общей хирургии (№ 8), сосудистой хирургии (№ 11) и урологическом отделении (№ 12). Штамм *K. pneumoniae* № 7, продуцирующий NDM карбапенемазу, был выделен из мочи пациента в день его поступления в ОРИТ ФГБУ «РНЦРХТ» (конец апре-

Таблица 2. Чувствительность к антимикробным препаратам карбапенемаза-продуцирующих изолятов грамотрицательных бактерий

Table 2. Susceptibility to antimicrobial agents carbapenemase-producing isolates of gram-negative bacteria

Изолят Isolate	Карбапенемаза Carbapenemase	МИК*, мкг/мл MIC*, µg/ml											Нечувствительность к категориям АМП** Non-susceptibility to category of AMA
		Амикацин Amikacin	Гентамицин Gentamicin	Нетилмицин Netilmicin	Азтреонам Aztreonam	Тигециклин Tigecycline	Цефепим Cefepime	Цефтазидим Ceftazidime	Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	Колистин Colistin	Импипенем Imipenem	Меропенем Meropenem	
<i>K. pneumoniae</i>													
1	ОХА48	2	1	1	64	н/о nd	64	64	1	0,5	2	1	2/6
56 5b	КРС	16	16	8	32	н/о nd	64	64	4	0,5	8	8	5/6
7	NDM	16	16	16	16	н/о nd	64	64	4	0,5	8	4	5/6
11	NDM	16	16	16	32	2	64	64	4	0,5	8	8	6/7
14a	ОХА48	4	16		32	н/о nd	64	64	2	0,5	16	4	5/6
186 18b	К*** С***	16	16	16	32	н/о nd	64	64	4	0,5	16	16	5/6
<i>S. marcescens</i>													
9	К С	8	8	8	32	н/о nd	32	32	4	16	8	16	6/6
<i>E. cloacae</i>													
106 10b	КРС	16	16	16	32	4	64	64	4	16	8	8	7/7
18в 18с	К С	2	16	4	32	н/о nd	64	64	4	0,5	2	16	5/6
<i>P. aeruginosa</i>													
2	КРС	2	16	16		н/о nd	4	4	4	0,5	8	8	3/5
10a	VIM	64	16	32		н/о nd	64	16	4	0,5	16	16	4/5
6	К С	4	4	4		н/о nd	16	64	1	0,5	16	16	4/5
<i>A. baumannii****</i>													
3	ОХА51/40/24	16	16	16	32	0,5	64	64	4	0,5	16	16	3/4
4	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
5a	ОХА51/40/24	16	16	16	32	32	64	64	4	0,5	16	16	3/4
8	К С	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
12	ОХА51	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	1	0,25	2/4
13	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
146 14b	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
15	ОХА51/40/24	64	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
16	ОХА51/40/24	16	16	16	32	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
17	ОХА51/40/24	16	16	32	64	4	64	64	4	0,5	16	16	3/4
18a	ОХА51/40/24	16	16	16	64	0,5	64	16	4	0,5	16	16	3/4

Примечания. *МИК-минимальная ингибирующая концентрация; н/о — не определялась. Жирным шрифтом выделены значения МИК АМП, соответствующие категории «нечувствительные» в соответствии с критериями EUCAST [25]. **В столбце указывается: количество категорий АМП с нечувствительностью бактерии хотя бы к одному препарату категории/количество протестированных категорий АМП. Категории в соответствии с Magiorakos et al. [19]. ***данные AES о наличии у изолята карбапенемазной активности. ****для АМП, выделенных серым фоном, пограничные значения МИК (MIC breakpoints) не определены [25].

Notes. *MIC-minimal inhibitory concentration; nd — not determined. MIC AMA corresponding category «nonsusceptible» according EUCAST criteria are given in bold [25]. In the column the following is indicated: number categories of AMA with non-susceptibility of the bacteria to at least one agent of the category/total number of the tested categories. The categories are given according to Magiorakos et al. [19]. ***information about carbapenemase activity of isolate is from AES. ****for AMA, highlighted with grey background, MIC breakpoints are not determined [25].

ля 2015). Поскольку пациент ранее не лечился в ФГБУ «РНЦРХТ», можно сделать вывод, что заражение пациента произошло вне данного стационара.

Клинический материал. Источниками выделения КНЧ штаммов ГОБ были кровь (n = 8), моча (n = 7), отделяемое дыхательных путей (n = 5), ликвор (n = 1), отделяемое брюшной полости (n = 1) и желчь (n = 1).

Видовой состав КНЧ изолятов. Среди 23 КНЧ штаммов ГОБ 9 изолятов относятся к энтеробактериям (6 *K. pneumoniae*, 1 *Serratia marcescens*, 2 *E. cloacae*), 3 изолята *P. aeruginosa* и 11 изолятов *A. baumannii* (рис., табл. 2).

Чувствительность изолятов к карбапенемам. Минимальные ингибирующие концентрации АМП для выделенных штаммов ГОБ, полученные с помощью анализатора ВИТЕК 2 приведены в табл. 2. Из 23 выросших на селективной среде КНЧ штаммов, 2 оказались

чувствительны к карбапенемам в соответствии с критериями EUCAST (МИК имипенема и меропенема ≤ 2) — *K. pneumoniae* № 1 и *A. baumannii* № 12. Остальные штаммы энтеробактерий либо резистентны к карбапенемам (МИК выше 8 мкг/мл), либо умереннорезистентны к ним ($2 < \text{МИК} \leq 8$). Все 3 штамма *P. aeruginosa* умереннорезистентны к меропенему ($1 < \text{МИК} \leq 16$), в то время как 2 из них резистентны к имипенему (МИК > 8). Десять из 11 штаммов *A. baumannii* резистентны к карбапенемам (МИК > 8). Таким образом, суммарная доля КНЧ (резистентные + умереннорезистентные) штаммов составила 5,2% (21 штамм) от общего числа выделенных штаммов ГОБ (405 штаммов). У пациентов № 5, 10, 14 и 18 одновременно обнаружены несколько видов КНЧ ГОБ (см. рис.).

Карбапенемазы, выявленные у изолятов. ПЦР была проведена для 19 из 21 КНЧ штаммов ГОБ

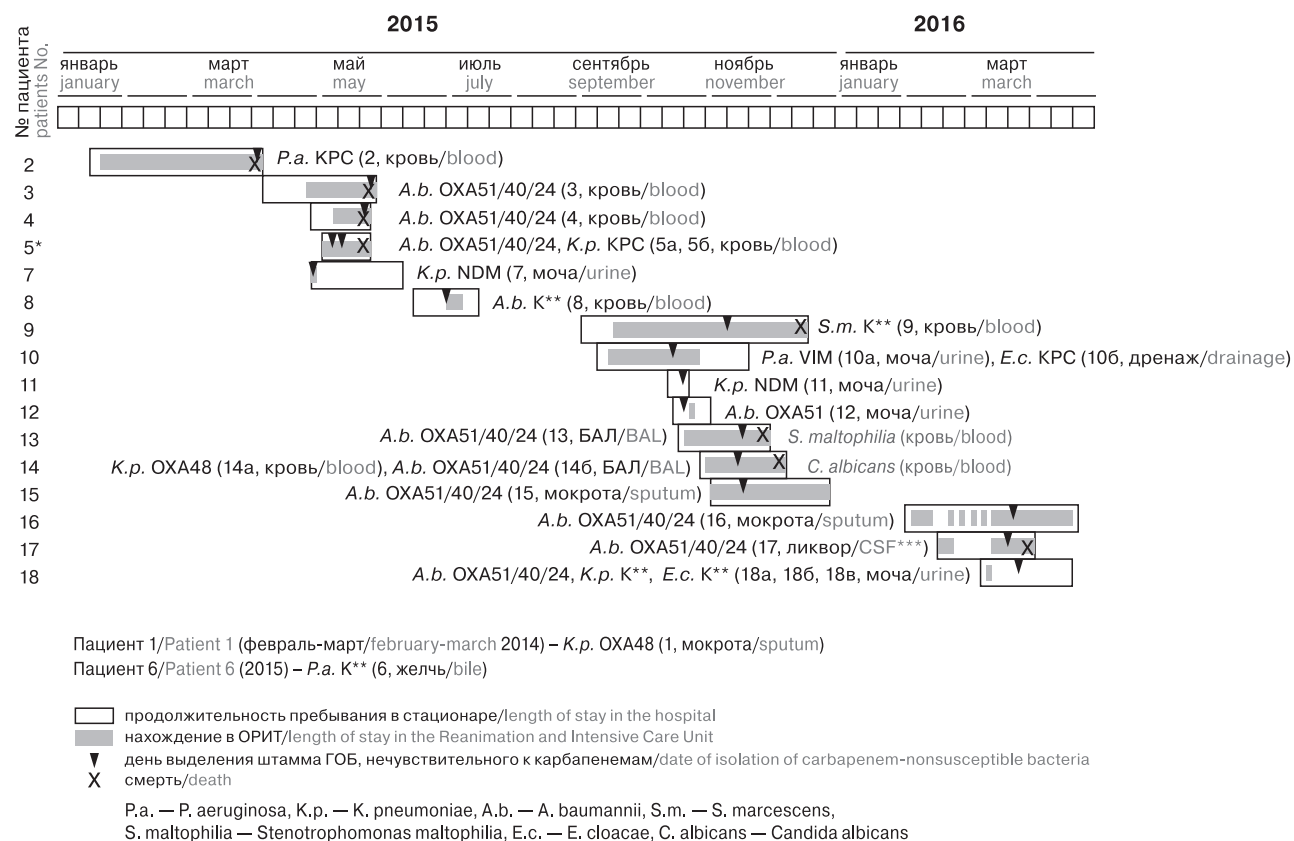


Рисунок. Распределение во времени и локализация пациентов, инфицированных карбапенемаза-продуцирующими грамотрицательными бактериями

Figure. Distribution in time and location of hospital stays of patients infected with carbapenemase-producing gram-negative bacteria

Примечания. После видового названия ГОБ, указано название выявленной карбапенемазы. В скобках указан номер изолята и источник его выделения. *Пациент поступил в ОРИТ ФГБУ «РНЦРХТ» из другого стационара. **Данные AES о наличии у изолята карбапенемазной активности.

Notes. After the species name the type of detected carbapenemase is given. The number and source of the isolate is in parentheses. *Patient admitted to the RICU of RRCRST from another hospital. **Information about carbapenemase activity of isolate is from AES. ***Cerebrospinal fluid.

(для штаммов № 8 и № 6 ПЦР не проводилась), в 16 из них (84%) были обнаружены гены карбапенемазы (рис. 1, табл. 2).

Во всех КНЧ штаммах *A. baumannii*, кроме № 12, был выявлен ген приобретенной карбапенемазы ОХА-40/24. ОХА-48-карбапенемаза выявлена в 2-х КНЧ штаммах *K. pneumoniae*. У двух из 6-ти КНЧ штаммов *K. pneumoniae* была выявлена NDM карбапенемаза. Оба штамма были выделены из мочи пациентов, находившихся в ФГБУ «РНЦРХТ» в марте (№ 7, отделение урологии) и октябре (№ 11, отделение сосудистой хирургии) 2015 г.

Из других металло-бета-лактамаз (МБЛ), обнаружена VIM МБЛ в одном КНЧ штамме *P. aeruginosa* (№ 10а). КРС карбапенемаза обнаружена в 3-х КНЧ изолятах: *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa*. В штаммах № 18б, № 18в и № 10а экспертная программа AES предположила наличие карбапенемаз, однако, гены карбапенемаз КРС, VIM, IMP, NDM, ОХА-48, 23, 58, 40/24 не выявлены. Возможно, что штаммы содержат карбапенемазы других типов.

Чувствительность изолятов к АМП других категорий. Все КНЧ штаммы ГОБ за исключением двух (*K. pneumoniae* № 1, *A. baumannii* № 12) обладают MDR фенотипом, поскольку нечувствительны одновременно к АМП по крайней мере трех категорий. Особо надо отметить 3 штамма: *E. cloacae* (№ 10б) нечувствительный ко всем протестированным АМП, включая колистин и тигециклин, штамм *S. marcescens* (№ 9), нечувствительный к колистину и один из двух NDM-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* (№ 11), нечувствительный к тигециклину.

Обсуждение

В настоящем исследовании были определены частота встречаемости, профиль чувствительности к АМП, видовой состав и типы карбапенемаз карбапенемаза-продуцирующих ГОБ.

Суммарная доля КНЧ штаммов составила 5,2% от общего числа выделенных в исследовании штаммов ГОБ. Видовой состав КНЧ штаммов соответствует таковому на территории России: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Доля нечувствительных к имипенему и меропенему изолятов *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* среди всех выделенных штаммов этих видов значительно ниже, чем в других стационарах России и составляет 7,2; 6; 6,8 и 27% соответственно [2–7, 9, 10, 16, 22]. Нами выявлено три случая зара-

жения одного пациента несколькими видами карбапенем-нечувствительных ГОБ. Случаи одновременного обнаружения нескольких КНЧ видов бактерий у одного пациента описаны в литературе и возможно являются следствием увеличения суммарного количества и разнообразия КНЧ видов ГОБ как в окружающей среде отдельных стационаров так и по всему миру [12].

У КНЧ штаммов были выявлены карбапенемазы типов NDM, VIM, КРС, ОХА-48 и ОХА40/24. Ген *bla*_{NDM} был обнаружен у двух из 6-ти КНЧ штаммов *K. pneumoniae*. Наличие гена *bla*_{NDM} обычно ассоциируется с устойчивостью бактерии к большинству используемых в клинике АМП. NDM карбапенемаза впервые была обнаружена в 2008 г. в штамме *K. pneumoniae*, полученном из образца мочи пациента из Индии [27]. К 2015 г. она распространилась глобально и была идентифицирована у разных видов энтеробактерий, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и других менее вирулентных видов бактерий [21]. В Санкт-Петербурге почти все полученные к 2013 г. госпитальные КНЧ штаммы *K. pneumoniae* являлись носителями гена *bla*_{NDM-1} [2, 9]. 80% из них имели МИКи имипенема между 4 и 16 мкг/мл и меропенема между 16 и 64 мкг/мл, остальные 20% выше данных значений [9]. Уровень резистентности к меропенему у штаммов в нашем исследовании значительно ниже 4–8 мкг/мл. В отличие от других исследований, проведенных в Санкт-Петербурге, мы не наблюдали превалирования NDM карбапенемазы у КНЧ штаммов *K. pneumoniae*. Кроме нее в 2-х КНЧ штаммах *K. pneumoniae* была выявлена ОХА-48-карбапенемаза. ОХА-48-карбапенемаза впервые идентифицирована у мультирезистентного нозокомиального штамма *K. pneumoniae*, выделенного в Турции в 2001 г. [11]. Начиная с 2010 г. она была обнаружена у госпитальных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в странах Среднего Востока, Северной Африки и Европе, а с 2011 г. в России [5, 23]. В 2012 г. ОХА-48-карбапенемаза была выявлена у мультирезистентного штамма *K. pneumoniae*, вызвавшего вспышку госпитальной инфекции в одном из стационаров Москвы [16]. В отношении уровня устойчивости к карбапенемам у ОХА-48-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в России, наблюдается превалирование двух групп: одна с МИК имипенема 32 мкг/мл (~50% штаммов), другая — 4 мкг/мл (~30% штаммов). Также 2 группы существуют для меропенема: около половины штаммов имеют МИК 32 мкг/мл и около трети —

0,5 мкг/мл [5]. В нашем исследовании, из 2-х штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген bla_{OXA-48} , один нечувствителен к имипенему и меропенему, а второй чувствителен к обоим карбапенемам. Различие в уровне чувствительности к карбапенемам может быть связано с функционированием различных механизмов резистентности как у наших штаммов, так и у выделенных в России другими исследователями. OXA-48 фермент имеет слабую активность в отношении карбапенемов, однако у мультирезистентных энтеробактерий она часто сочетается с повышенной экспрессией бета-лактамаз расширенного спектра (extended-spectrum β -lactamase — ESBL), имеющих некоторую карбапенемазную активность (например, СТХ-М бета-лактамаза), и уменьшенной проницаемостью наружной мембраны, чем может достигаться высокий уровень резистентности к карбапенемам у OXA-48 продуцентов [23].

КРС карбапенемаза обнаружена нами в 3-х КНЧ изолятах: *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa*. МИКи имипенема и меропенема у всех 3-х изолятов — 8 мкг/мл. Ген bla_{KPC-1} с плазмидной локализацией был идентифицирован в 2001 г. у госпитального штамма *K. pneumoniae*, выделенного в 1996 г. в Америке и имевшего МИКи имипенема и меропенема 16 мкг/мл [26]. В России до настоящего времени описаны единичные случаи обнаружения этой карбапенемазы.

Из металло-бета-лактамаз (МБЛ), кроме NDM карбапенемазы, нами обнаружена VIM МБЛ в одном штамме *P. aeruginosa*. VIM-продуцирующий штамм *P. aeruginosa* был впервые выделен из раны хирургического больного в 1997 г. в Италии [18]. К 2005 г. VIM МБЛ распространилась глобально [21]. В России количество штаммов *P. aeruginosa*, продуцирующих МБЛ, увеличилось с 0% в 1999 г. до 28% в 2012 г., причем единственной МБЛ, выявленной у *P. aeruginosa* в 2012 г. была МБЛ VIM-типа с МИК имипенема 128 мкг/мл и меропенема ≥ 32 мкг/мл [7, 13]. VIM-продуцирующий штамм *P. aeruginosa*, выделенный в нашем исследовании, имеет значительно меньший уровень резистентности с МИК обоих карбапенемов 16 мкг/мл.

У всех штаммов *A. baumannii* выявлен ген карбапенемазы OXA51, что соответствует литературным данным о том, что наличие гена bla_{OXA-51} в геноме *A. baumannii* является видовым признаком этой бактерии [15]. Ген bla_{OXA-51} , имеет хромосомную локализацию, и если не изменен геномными перестройками в промоторной области, слабо экспрессируется и не придает бактерии резистентный к кар-

бапенемам фенотип [15]. Этим может объясняться тот факт, что штамм № 12, в котором обнаружен только ген bla_{OXA-51} , чувствителен к обоим протестированным карбапенемам. Во всех штаммах *A. baumannii*, кроме № 12, был выявлен также ген OXA-40/24 карбапенемазы, что соответствует эпидемиологическим данным о широкой распространенности на территории России бета-лактамазы OXA-40/24 типа у нозокомиальных штаммов *A. baumannii* [3]. Поскольку в нашем исследовании не проводилось молекулярное типирование штаммов *A. baumannii*, сделать заключение о клональности распространения OXA40/24-продуцентов затруднительно. Интересно заметить, что в отличие от OXA-40/24-продуцирующих штаммов *A. baumannii*, выделенных в стационарах России, которые в большинстве случаев имеют высокий уровень устойчивости к имипенему и меропенему с типичными МИК 128 мкг/мл, OXA-40/24-продуценты в нашем исследовании имеют сравнительно низкие значения МИК этих карбапенемов — 16 мкг/мл [6].

90% КНЧ штаммов в нашем исследовании обладают MDR фенотипом. В целях стандартизации описания и классификации бактерий, устойчивых одновременно ко многим АМП, экспертной группой Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease — ESCMID) для каждой бактерии или группы бактерий был предложен список «категорий» АМП для определения фенотипов MDR, XDR и PDR [19]. Для определения MDR, XDR и PDR у бактерий семейства *Enterobacteriaceae* предложено использовать 17 категорий АМП (содержащих 28 АМП), у *P. aeruginosa* — 8 категорий (17 АМП) и у *A. baumannii* — 9 категорий (22 АМП). В соответствии с выработанными экспертной группой критериями, бактерия обладает MDR фенотипом, если она нечувствительна как минимум к 3-м препаратам, относящимся к различным категориям АМП; XDR фенотипом, если она нечувствительна хотя бы к одному препарату всех кроме одной-двух категорий АМП и PDR фенотипом, если она нечувствительна ко всем препаратам всех категорий АМП [19]. В нашем исследовании тестировалась чувствительность карбапенемаза-продуцирующих изолятов к АМП 6–7 категорий АМП. Все штаммы бактерий за исключением двух (*K. pneumoniae* № 1, *A. baumannii* № 12) обладали MDR фенотипом, поскольку были нечувствительны одновременно к АМП по крайней мере трех

категорий. Обладал ли какой-либо изолят XDR/PDR фенотипом определить не удалось, так как для этого необходимы данные по чувствительности изолятов к большему количеству АМП, чем было протестировано в нашем исследовании.

Заключение

Исследование проводилось с февраля 2014 г. по апрель 2016 г. В течение этого периода было выделено 405 штаммов грамотрицательных бактерий из клинического материала пациентов. Выделен 21 штамм (суммарная доля 5,2% среди штаммов ГОБ), нечувствительных к имипенему и/или меропенему ГОБ, причем показано, что пациент одновременно может быть инфицирован карбапенем-нечувствительными штаммами разных видов ГОБ. Уровень резистентности к имипенему и меропенему выделенных карбапенемаза-продуцирующих штаммов значительно ниже типичного для таких штаммов, выделенных в стационарах России. Видовой состав карбапенемаза-продуцирующих КНЧ ГОБ и типы обнаруженных приобретенных карбапанемаз характерны для территории России: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и КРС, ОХА-48, VIM,

NDM, ОХА40/24 соответственно. Хотя у отдельных видов энтеробактерий и *P. aeruginosa* не обнаружено превалирования какого-либо одного типа карбапенемаз, все выявленные карбапенем-нечувствительные штаммы *A. baumannii* — продуценты ОХА40/24 карбапенемазы. 96% карбапенемаза-продуцирующих штаммов ГОБ имели фенотип множественной резистентности к антимикробным препаратам, причем три из них были нечувствительны к колистину и/или тигециклину.

В заключение следует заметить, что хотя суммарная доля карбапенем-нечувствительных штаммов ГОБ, выделенных в исследовании, сравнительно невелика, все они обладают множественной устойчивостью к АМП и в большинстве из них обнаружены гены приобретенных карбапенемаз, что в совокупности делает эти штаммы особо эпидемиологически и клинически опасными.

Благодарность

Выражаем благодарность сотруднику ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Савочкиной Ю.А. за предоставленный набор реагентов и методику для выявления генов ОХА-карбапенемаз ацинетобактеров.

Список литературы/References

1. Бабенко Д.Б., Лавриненко А.В., Захарова Е.А., Шамбилова Н.А., Азизов И.С. Лабораторная детекция карбапенемаза-продуцирующих энтеробактерий // Лабораторная медицина. 2012–2013. Т. 1–2, № 4. С. 47–61. [Babenko D.B., Lavrinenko A.V., Zakharova E.A., Shamilova N.A., Azizov I.S. Laboratory detection of carbapenemase-producing enterobacteria. *Laboratornaya meditsina = Laboratory Medicine*, 2012–2013, vol. 1–2, no. 4, pp. 47–61. (In Russ.)]
2. 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., Сужаева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльялг С., Мицюлявичене И., Балод А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-β-лактамазу NDM-1, выделены 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., Ostantkova J.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.)]
3. Мартинович А.А., Эйдельштейн М.В. Рост нечувствительности к карбапенемам и частоты продукции карбапенемаз у нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в России в 2002–2012 гг. // Вестник Смоленской Государственной Медицинской Академии. 2014. Т. 13, № 2. С. 34–39. [Martynovich A.A., Edelstein M.V. Increase of carbapenem-non-susceptibility and carbapenemase production rate in nosocomial *Acinetobacter* spp. in Russia in 2002–2012. *Vestnik Smolenskoi Gosudarstvennoi Meditsinskoi Akademii = Herald of the Smolensk State Academy*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 34–39. (In Russ.)]
4. Светличная Ю.С. Распространение карбапенем устойчивых штаммов *A. baumannii* в многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга // Медицинский альманах. 2015. Т. 5, № 40. С. 102–105. [Svetlichnaya Yu.S. Spread of carbapenem-resistant strains of *A. baumannii* in multipurpose day-and-night clinics of Saint Petersburg. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2015, vol. 5, no. 40, pp. 102–105. (In Russ.)]
5. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 4. С. 254–265. [Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Sheck E.A., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., «MARATHON» Study Group. Antimicrobial resis-

- tance of nosocomial Enterobacteriaceae isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study «MARATHON» 2011–2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, vol. 16, no. 4, pp. 254–265. (In Russ.)
6. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 4. С. 266–272. [Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Sheck E.A., Dekhnich A.V., Kozlov R.S., «MARATHON» Study Group. Antimicrobial resistance of nosocomial *Acinetobacter* spp. isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study «MARATHON» 2011–2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, vol. 16, no. 4, pp. 266–272. (In Russ.)]
 7. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 4. С. 273–279. [Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Sheck E.A., Dekhnich A.V., Kozlov R.S., «MARATHON» Study Group. Antimicrobial Resistance of Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study «MARATHON» 2011–2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, vol. 16, no. 4, pp. 273–279. (In Russ.)]
 8. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции // Медицинский журнал. 2012. Т. 2, № 40. С. 10–15. [Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal*, 2012, vol. 2, no. 40, pp. 10–15. (In Russ.)]
 9. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Yu.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2014, vol. 44, no. 2, pp. 152–155.
 10. Barantsevich E.P., Churkina I.V., Barantsevich N.E., Pelkonen J., Schlyakhto E.V., Woodford N. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013, vol. 68, no. 5, pp. 1204–1206.
 11. Carrër A., Poirel L., Eraksoy H., Cagatay A.A., Badur S., Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, vol. 52, no. 8, pp. 2950–2954. doi: 10.1128/AAC.01672-07
 12. Creighton J., Heffernan H., Howard J. Isolation of seven distinct carbapenemase-producing gram-negative organisms from a single patient. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 317–319. doi: 10.1093/jac/dkw378
 13. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S., Sukhorukova M.V., Pavlukov R.A., Kozlov R.S., Toleman M.A., Walsh T.R. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, no. 10, pp. 867–876. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70168-3
 14. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project. *Stockholm: ECDC 2013*. URL: <http://www.ecdc.europa.eu>
 15. Evans B.A., Amyes S.G. OXA β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, vol. 27, no. 2, pp. 241–263. doi: 10.1128/CMR.00117-13
 16. Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., Kartsev N.N., Leonova E.S., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Kurdyumova N.V., Sazikina S.Yu., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Dyatlov I.A. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2015, vol. 14, pp. 46–53.
 17. Gutkind G., Di Conza J., Power P., Radice M. β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, vol. 19, no. 2, pp. 164–208.
 18. Lauretti L., Riccio M., Mazzariol A., Cornaglia G., Amicosante G., Fontana R., Rossolini G.M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 7, pp. 1584–1590.
 19. 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, pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
 20. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther. Adv. Infect. Dis.*, 2016, vol. 3, no. 1, pp. 15–21. doi: 10.1177/2049936115621709
 21. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med. Mal. Infect.*, 2014, vol. 44, no. 2, pp. 51–56. doi: 10.1016/j.medmal.2013.11.007
 22. Nordmann P., Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, pp. 821–830. doi: 10.1111/1469-0691.12719
 23. Poirel L., Potron A., Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, vol. 67, no. 7, pp. 1597–1606. doi: 10.1093/jac/dks121
 24. Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, vol. 20, no. 3, pp. 440–458. doi: 10.1128/CMR.00001-07

25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. URL: <http://www.eucast.org>
26. Yigit H., Queenan A.M., Anderson G.J., Domenech-Sanchez A., Biddle J.W., Steward C.D., Alberti S., Bush K., Tenover F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 4, pp. 1151–1161. doi: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001
27. Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., Walsh T.R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, no. 12, pp. 5046–5054. doi: 10.1128/AAC.00774-09

Авторы:

Полищук А.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Якубович Е.И., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Полухина О.В., к.м.н., зав. бактериологической лабораторией ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Осовских В.В., к.м.н., руководитель группы анестезиологии и реаниматологии ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Евтушенко В.И., д.б.н., руководитель лаборатории генной инженерии ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Polischouk A.G., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Gene Engineering, Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation;

Jakubovich E.I., PhD (Biology), Leading Researcher Laboratory of Gene Engineering, Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation;

Poluhina O.V., PhD (Medicine), Head of Bacteriological Laboratory, Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation;

Osovskich V.V., PhD (Medicine), Head of Anesthesiology and Rheumatology Group, Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation;

Evtushenko V.I., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory of Gene Engineering, Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.11.2016
Принята к печати 16.01.2017

Received 23.11.2016
Accepted 16.01.2017

ИММУНОГЕННОСТЬ ИММУНОАДЬЮВАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА У БЕРЕМЕННЫХ

М.П. Костинов^{1,2}, А.П. Черданцев³, А.Д. Шмитько¹, Д.А. Праулова⁴,
А.Д. Протасов⁵, Ю.А. Дагиль⁶, Т.А. Костинова¹, Н.К. Ахматова¹,
Е.А. Хромова¹, А.А. Рыжов¹, Д.А. Благовидов¹, В.Б. Полищук¹,
О.О. Магаршак¹, Е.С. Коровкина¹

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия

⁴Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

⁵ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

⁶Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. Эпидемиологические события последних лет показали, что наиболее уязвимым контингентом осложненного течения гриппа с высоким риском его летальных исходов являются беременные. В этой связи в нашей стране вакцинопрофилактика гриппа групп повышенного риска, в том числе беременных, является одним из приоритетных направлений государственного здравоохранения. Имеющийся мировой опыт вакцинации детей и взрослых против гриппа новым поколением адьювантных препаратов послужил поводом изучения их эффективности среди беременных. Целью исследования явилось изучение уровня антител к штаммам вируса гриппа А/Н1N1/ν, А/Н3N2 и В у беременных, вакцинированных отечественной полимер-субъединичной трехвалентной иммуноадьювантной вакциной. Работа являлась рандомизированной, сравнительной на параллельных группах и выполнена с учетом требований российских и международных этических норм, применяемым к исследованиям такого уровня. Оценка иммуногенности вакцины была проведена у 27 беременных на II и 23 — на III триместре гестации, а также у 19 небеременных женщин. Уровень антител в сыворотке венозной крови определяли с использованием реакции торможения гемагглютинации до и через 1, 3, 6, 9 и 12 мес. после вакцинации. Установлено, что иммунизация беременных против гриппа во II и III триместрах вызывает увеличение титра антител к вакцинным штаммам гриппа А и В, полностью отвечая необходимым критериям, предъявляемым СРМР, и не отличается от группы небеременных. Через 1 месяц после вакцинации уровень серопротекции к вирусу гриппа А/Н1N1/ν составил 77,0%, А/Н3N2 — 88,9%, В — 85,2% при иммунизации во II триместре, и 87,0; 87,0; 91,3% — в III триместре гестации. Фактор сероконверсии при вакцинации во II триместре для А/Н1N1/ν был равен 6,5, А/Н3N2 — 7,2, В — 6,5, при вакцинации в III триместре беременности: 7,1; 6,5 и 5,1 соответственно. Выявлена тенденция к ускоренному снижению титра антител против гриппа у беременных, по сравнению с небеременными женщинами, через 1 год после иммунизации.

Адрес для переписки:

Коровкина Елена Сергеевна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А,
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (916) 717-61-15 (моб.).
E-mail: eskorovkina@yandex.ru

Contacts:

Elena S. Korovkina
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazennyi lane, 5A,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (916) 717-61-15 (mobile).
E-mail: eskorovkina@yandex.ru

Библиографическое описание:

Костинов М.П., Черданцев А.П., Шмитько А.Д., Праулова Д.А., Протасов А.Д., Дагиль Ю.А., Костинова Т.А., Ахматова Н.К., Хромова Е.А., Рыжов А.А., Благовидов Д.А., Полищук В.Б., Магаршак О.О., Коровкина Е.С. Иммуногенность иммуноадьювантной вакцины против гриппа у беременных // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 193–202. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-193-202

Citation:

Kostinov M.P., Cherdantsev A.P., Shmitko A.D., Praulova D.A., Protasov A.D., Dagil U.A., Kostinova T.A., Akhmatova N.K., Chromova E.A., Ryzhov A.A., Blagovidov D.A., Polishchuk V.B., Magarshak O.O., Korovkina E.S. Immunogenicity of adjuvant influenza vaccine for pregnant women // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 193–202. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-193-202

По совокупности результатов исследования можно заключить, что отечественная субъединичная трехвалентная иммуoadъювантная вакцина эффективна при вакцинации беременных во II и III триместрах беременности, и способна эффективно поддерживать иммунопротекцию против вирусов гриппа А и В на весь период вынашивания плода.

Ключевые слова: грипп, иммуoadъювантные вакцины, вакцинация беременных, субъединичная трехвалентная иммуoadъювантная вакцина, поствакцинальный иммунный ответ.

IMMUNOGENICITY OF ADJUVANT INFLUENZA VACCINE FOR PREGNANT WOMEN

Kostinov M.P.^{a,b}, Cherdantsev A.P.^c, Shmitko A.D.^a, Praulova D.A.^d, Protasov A.D.^e, Dagil U.A.^f, Kostinova T.A.^a, Akhmatova N.K.^a, Chromova E.A.^a, Ryzhov A.A.^a, Blagovidov D.A.^a, Polishchuk V.B.^a, Magarshak O.O.^a, Korovkina E.S.^a

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^c Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^d Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^e Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

^f Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Recent epidemiological events showed that pregnant women are the most vulnerable part of population if there is the flu in the country and they die much more often than the rest part of people. That is why influenza vaccination of population including pregnant women is one of the priorities of public health service in our state. Worldwide experience of influenza vaccination of either adults or children by new adjuvant vaccine has caused our research of its efficiency among pregnant women. The aim of the study was to investigate the level of antibodies to influenza virus strain A/H1N1/v, A/H3N2 and B in pregnant women vaccinated adjuvant trivalent subunit vaccine. Our research is randomized and comparative on parallel groups. It was carried out within the demands of Russian Federation and International ethic norms adapted to such kind of researches. Evaluation of the immunogenicity of the vaccine was conducted in 27 pregnant women in the II trimester of gestation, and in 23 pregnant women in the III trimester of gestation, 19 non-pregnant women was in the control group. The level of antibodies in the serum was determined using a reaction of hemagglutination inhibition before and 1, 3, 6, 9 and 12 months after the vaccination. Revealed that influenza vaccination of pregnant women in the II and III trimester, causes the increase in titers of antibodies to vaccine influenza strains A and B, to fully meet the required criteria CPMP, and does not differ from the nonpregnant group. In a month after vaccination the level of seroprotective against A/H1N1/v was 77.0%, A/H3N2 — 88.9%, B — 85.2% after vaccination in II trimester, and 87.0; 87.0; 91.35% in III trimester of gestation. The factor of seroconversion after vaccination in II trimester for A/H1N1/v was equal to 6.5, A/H3N2 — 7.2, B — 6.5, after vaccination in III trimester of pregnancy: 7.1, 6.5 and 5.1 correspondingly. At the same time revealed accelerated decline in antibody titer against influenza in pregnant women compared to nonpregnant women in a year after immunization. The set of results of the study can be concluded that adjuvant trivalent subunit vaccine effective in vaccination of pregnant women in II and III trimester of pregnancy, and it is able to effectively provide immune protection against viruses of the flu A and B within all pregnancy long.

Key words: influenza, immunoadjuvant vaccines, vaccination of pregnant women, subunit trivalent immunoadjuvant vaccine, postvaccinal immune response.

Введение

Вакцинопрофилактика гриппа является одним из приоритетных направлений государства по снижению заболеваемости, количества инфекционных осложнений и летальных исходов у населения и, особенно, у групп риска, к которым относятся беременные. Поиск новых технологий по разработке вакцинных препаратов против гриппа, эффективность которых должна превосходить существующие как по интенсивности формирования, так и по длительности сохранения специфических антител, диктует необходимость из-

учения их применения не только у здоровых, но и у иммунокомпрометированных лиц. Несмотря на более чем 20-летний период использования отечественной субъединичной иммуoadъювантной вакцины против гриппа, иммуногенность ее у беременных, кроме доклинических исследований, не изучалась. С момента появления сплит-вакцин и, в последующем, субъединичных вакцин против гриппа, была показана их безопасность и иммуногенность у женщин в период гестации. В Российской Федерации до 2009 г. не существовало официальных рекомендаций по вакцинопрофилактике беременных против грип-

па, что способствовало возникновению опасений среди врачей по поводу их иммунизации. Единственные документированные рекомендации по вакцинации данной когорты населения появились на пороге пандемии гриппа в 2009 г. и были основаны на существующих международных рекомендациях [9]. В России на тот момент длительное время применялась отечественная субъединичная иммуноадьювантная вакцина против гриппа, показавшая свою безопасность и иммуногенность для всех категорий населения [5, 6]. При этом как у детей, так и у взрослых, имеющих различные нарушения состояния здоровья, вакцинация против гриппа приводила к формированию стойкого иммунитета и благоприятно отражалась на клиническом течении основного заболевания [1, 2, 8, 10, 13, 14, 15, 22]. Таким образом, мировой опыт применения адьювантных вакцин против гриппа у беременных послужил основанием для изучения клинко-иммунологической эффективности вакцинации беременных против гриппа с использованием отечественной субъединичной иммуноадьювантной вакцины, согласно международному протоколу исследования иммунобиологических препаратов СРМР (Committee for Proprietary Medicinal Products).

Цель исследования: оценить уровень антител к штаммам вируса гриппа у вакцинированных беременных.

Материалы и методы

Под наблюдением находились беременные женщины в возрасте от 20 до 40 лет во II (группа I, n = 27) и в III (группа II, n = 23) триместрах гестации, которые однократно вакцинировались против гриппа с использованием субъединичной иммуноадьювантной вакцины «Гриппол® плюс» с учетом показаний и противопоказаний. Группу сравнения (группа III) составили 19 небеременных женщин детородного возраста (20–40 лет).

Все женщины до включения в исследование подписывали добровольное информированное согласие и были ознакомлены с требованиями протокола, утвержденного на заседании Этического комитета института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского государственного университета (протокол № 2 от 18 января 2010 г.). Все кандидаты на участие в программе исследования предварительно оценивались по критериям включения и невключения из протокола. Исследование являлось рандомизированным сравнительным на параллельных группах.

Вакцинация беременных против гриппа проводилась в эпидемиологические сезоны 2009–2010 и 2010–2011 гг., в которые штаммовый состав вакцинных препаратов был аналогичен. Уровень антител в сыворотке венозной крови исследовали до и через 1, 3, 6, 9 и 12 мес. после вакцинации.

Используемая для вакцинации против гриппа беременных и небеременных женщин полимер-субъединичная трехвалентная вакцина «Гриппол® плюс» (ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) содержит антигены вируса гриппа А (H1N1 и H3N2) и В производства «Abbott Laboratories» (Нидерланды) — по 5 мкг антигена на каждый вирусный штамм, а также иммуноадьювант Полиоксидоний (500 мкг на 1 дозу), не содержит консерванта. Препарат вводился внутримышечно или глубоко подкожно однократно в дозе 0,5 мл.

Уровень антител к штаммам вируса гриппа А и В оценивали в реакции торможения гемагглютинации с использованием 0,75% взвеси эритроцитов петуха с предварительным нагреванием исследуемых сывороток до 56°C в течение 1 ч. В качестве антигенов использовали А/California/7/2009/H1N1/v-подобный штамм, А/H3N2/(Victoria)-подобный штамм, В(Brisbane)-подобный штамм. В качестве эталона оценки иммуногенности вакцины ориентировались на критерии эффективности вакцин, разработанные для стандартного взрослого человека, установленные Комитетом по Патентам медицинских продуктов (Committee for Proprietary Medicinal Products [CPMP]) — протокол CPMP/BWP/214/96:

- уровень серопротекции — процент привитых, у которых титр гемагглютинин-ингибирующих антител составляет более 1:40 к 21 дню после проведения вакцинации (должен быть более 70%);
- уровень сероконверсии или иммунологическая активность вакцины — относительное число привитых, у которых титр гемагглютинин-ингибирующих антител повысился более чем в 4 раза по сравнению с исходным уровнем среди всех иммунопротективных людей (должен быть более 40%);
- фактор сероконверсии или средний геометрический прирост — повышение средних геометрических титров гемагглютинин-ингибирующих антител на 21 день по сравнению с исходным уровнем, выражающийся в кратности увеличения (должен быть более 2,5).

Вакцина считается достаточно иммуногенной и эффективной, если она удовлетворяет, по крайней мере, одному из трех критериев.

Таблица 1. Уровень серопротекции у беременных, вакцинированных субъединичной иммуноадьювантной вакциной, с учетом триместра гестации
 Table 1. Seroprotective antibodies level among pregnant women vaccinated by adjuvant trivalent subunit vaccine (taking into consideration trimester of gestation)

Периоды наблюдения Periods of control	Группа I II триместр (n = 27) Group I II trimester (n = 27)			Группа II III триместр (n = 23) Group II III trimester (n = 23)			Группа III Небеременные (n = 19) Group III Non-pregnant (n = 19)		
	A/H1N1/v	A/H3N2	B	A/H1N1/v	A/H3N2	B	A/H1N1/v	A/H3N2	B
До вакцинации (V) Before vaccination	3,7	11,1	22,2	8,7	13,0	26,1	2,6	14,1	25,7
1 месяц после V 1 st month after V	77,0 *	88,9 *	85,2 *	87,0 *	87,0 *	91,3 *	83,1 *	90,2 *	94,4 *
3 месяца после V 3 rd month after V	74,8	88,4	84,2	–	–	–	80,6	88,7	92,0
6 (3) месяцев после V/ 2–3 день после родов/ 6 (3) months after V/ 2–3 day after delivery	74,1	81,5	77,8	62,0	76,2	71,4	78,5	83,1	88,2
9 (6) месяцев после V/ 3 месяца после родов/ 9 (6) months after V/ 3 months after delivery	57,7 x	69,2	65,4	57,1 x	71,4	62,0	71,4	78,6	72,8
12 (9) месяцев после V/ 6 месяцев после родов/ 12 (9) months after V/ 6 months after delivery	48,2 **/1-3	65,4 **	57,7 **/1-3	50,0 **/2-3	61,1 **	55,6 **/2-3	67,6 **	72,5 **	69,1 **

Примечания: в скобках указан период времени, прошедший от момента вакцинации женщин II группы в III триместре беременности; * — различия статистически значимы (p < 0,05) при сравнении показателей между «до вакцинации (V)» и «1 мес. после V» — внутри групп I, II, III; ** — различия статистически значимы при сравнении показателей между «1 мес. после V» и «12 (9) мес. после V» — внутри групп I, II, III; 1,2-3 — различия статистически значимы при сравнении показателей женщин I, II групп и III группы.

Notes: There is a period of time in brackets that past since the time of vaccination of women of group II in 3rd trimester of gestation; * — difference is statistically important (p < 0.05) if compare the results of "before vaccination (V)" and "1 month after V" inside groups I, II, III; ** — difference is statistically important if compare the results of "1 month after V" and "12 (9) months after V" inside groups I, II, III; 1,2-3 — difference is statistically important if compare the results of women of groups I, II and group.

Таблица 2. Уровень и фактор сероконверсии у беременных, вакцинированных субъединичной иммуноадьювантной вакциной, с учетом триместра гестации

Table 2. Seroconversion level and factor among pregnant women vaccinated by adjuvant trivalent subunit vaccine (taking into consideration trimester of gestation)

Параметр Parameter	Группа I II триместр (n = 27) Group I II trimester (n = 27)			Группа II III триместр (n = 23) Group II III trimester (n = 23)			Группа III Небеременные (n = 19) Group III Non-pregnant (n = 19)		
	A/H1N1	A/H3N2	B	A/H1N1	A/H3N2	B	A/H1N1	A/H3N2	B
Уровень сероконверсии, % The level of seroconversion, %	70,4	77,8	74,1	69,6	78,3	65,2	71,5	81,1	70,3
Фактор сероконверсии Factor of seroconversion	6,5	7,2	6,5	7,1	6,5	5,1 ²⁻³	6,8	7,6	6,9

Примечания: ²⁻³ — различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей женщин II и III группы.Notes: ²⁻³ — difference is statistically significant ($p < 0.05$) if compare data of women of group II and III.

Статистический анализ для выборок, не подчиняющихся закону нормального распределения, проводился с применением непараметрических критериев, при нормальном распределении использовали параметрические критерии. В процессе статистического анализа пользовались пакетом прикладных программ «Microsoft Excel», приложением «AtteStat» (версия 10.10.2). Различия считали достоверными при получении $p < 0,05$.

Результаты

Субъединичная иммуноадьювантная вакцина содержит антигены трех разновидностей вируса гриппа, поэтому для оценки ее эффективности определяли титр антител с различной штаммовой специфичностью до и после вакцинации (табл. 1).

Анализируя уровень серопротекции, характеризующийся количеством лиц, содержащих средний и высокий титры антител ($\geq 1:40$), отмечено, что еще до проведения вакцинации у части женщин выявлялся титр антител к штаммам вируса гриппа в различной концентрации. Данный факт свидетельствует о том, что определенная прослойка лиц, независимо от физиологического состояния их организма на момент вакцинации, являлась носителем иммунной памяти о перенесенной ранее инфекции, обусловленной вирусом гриппа. Указанный показатель у всех обследуемых женщин был выше к вирусу гриппа В (22,2% — группа I, 26,1% — группа II и 25,7% — группа III). Через 1 месяц после иммунизации в исследуемых группах выявлено увеличение уровня серо-

протекции к штаммам вируса гриппа, входящим в состав вакцины, полностью отвечающее одному из критериев СРМР ($p < 0,05$) (табл. 1). В динамике поствакцинального периода наблюдалось постепенное снижение данного показателя, достигающее достоверных различий к 3 месяцам после родов у женщин I и II групп (вакцинированных во II и III триместрах соответственно) только по отношению к штамму вируса гриппа А/Н1N1/у ($p < 0,05$). Через 6 месяцев после родов (группы I и II) или 12 месяцев после вакцинации (группа III) во всех группах регистрировалась существенная утрата частью лиц антител к вирусу гриппа вакцинных штаммов. Наиболее выраженная регрессия уровня серопротекции наблюдалась в отношении антител к вирусу штаммов А/Н1N1/у, А/Н3N2 и В у женщин, вакцинированных во время беременности во II и III триместрах ($p < 0,05$). Подобная тенденция прослеживалась и у небеременных женщин, однако в данной группе сохранялось достаточно большое количество лиц, содержащих высокий уровень защитных антител, и достоверных различий выявлено не было ($p > 0,05$).

Показатели скорости и интенсивности формирования протективного иммунитета — уровень и фактор сероконверсии, в сравниваемых группах, по всем штаммам вируса гриппа имели значения, отвечающие требованиям критериев СРМР (табл. 2).

Большинство полученных значений исследуемых показателей не имели различий между сравниваемыми группами. Исключение составили значения фактора сероконверсии по штамму вируса гриппа В у беременных, вак-

Таблица 3. Средняя геометрическая величина титра антител у беременных, вакцинированных субъединичной иммуноадьювантной вакциной, с учетом триместра гестации

Table 3. The average antibody geometric titer in pregnant women vaccinated by adjuvant trivalent subunit vaccine (taking into consideration trimester of gestation)

Периоды наблюдения Periods of control	Группа I II триместр (n = 27) Group I II trimester (n = 27)			Группа II III триместр (n = 23) Group II III trimester (n = 23)			Группа III Небеременные (n = 19) Group III Non-pregnant (n = 19)		
	A/H1N1/v	A/H3N2	B	A/H1N1/v	A/H3N2	B	A/H1N1/v	A/H3N2	B
До вакцинации (V) Before vaccination	7,54±0,17	8,79±0,23	13,96±0,26	8,60±0,23	10,62±0,24	14,36±0,25	8,02±0,15	9,12±0,21	14,19±0,21
1 месяц после V 1 st month after V	49,12±0,29 ¹⁻²	63,49±0,28	90,96±0,36	60,99±0,25	68,81±0,26	73,08±0,24	52,12±0,22	59,47±0,24	81,11±0,37
3 месяца после V 3 rd month after V	47,87±0,27	55,85±0,26	65,15±0,35	–	–	–	51,31±0,24	57,73±0,31	73,88±0,26
6 (3) месяцев после V/ 2-3 день после родов/ 6 (3) months after V/ 2-3 day after delivery	41,04±0,23	44,33±0,22	47,87±0,32	41,34±0,30	45,64±0,25	42,72±0,30 ²⁻³	48,56±0,22	55,53±0,24	63,13±0,36
9 (6) месяцев после V/ 3 месяца после родов/ 9 (6) months after V/ 3 months after delivery	30,64±0,23	29,83±0,22 ¹⁻³	32,32±0,29	30,72±0,31	31,75±0,32 ²⁻³	26,92±0,35 ²⁻³	44,82±0,25	51,79±0,23	57,71±0,31
12 (9) месяцев после V/ 6 месяцев после родов/ 12 (9) months after V/ 6 months after delivery	21,67±0,24 ^{**/1-3}	24,10±0,26 ^{**/1-3}	25,42±0,25 ^{**/1-3}	20,79±0,34 ^{**/2-3}	25,19±0,33 ^{**/2-3}	19,24±0,35 ^{**/2-3}	38,17±0,26 ^{**}	44,47±0,21 ^{**}	50,03±0,28 ^{**}

Средняя геометрическая титра антител (log₂СМТ АВ)
Mean geometric titer (log₂СМТ АВ)

Примечания: в скобках указан период времени, прошедший от момента вакцинации женщин II группы в III триместре беременности; ¹⁻² — различия статистически значимы (p < 0,05) при сравнении показателей женщин II группы; ** — различия статистически значимы при сравнении показателей между «1 мес. после V» и «12 (9) мес. после V» внутри групп I, II, III; ^{1,2-3} — различия статистически значимы при сравнении показателей женщин I, II групп и III группы.

Notes: There is a period of time in brackets that past since the time of vaccination of women of group II in 3rd trimester of gestation; ¹⁻² — difference is statistically important (p < 0.05) if compare the results of women of groups I and II; ** — difference is statistically important if compare the results of «1 month after vaccination (V)» and «12 (9) months after V» inside groups I, II, III; ^{1,2-3} — difference is statistically important if compare the results of women of groups I, II and group III.

цинированных в III триместре гестации (5,1), по отношению к аналогичному показателю в группе небеременных женщин (6,9) ($p < 0,05$).

Динамика титров антител, оцениваемая по средней геометрической величине (средняя геометрическая титра антител — СГТ АТ), отражает снижение концентрации антител с течением времени в поствакцинальном периоде (табл. 3).

Отмечено, что через 1 месяц после иммунизации СГТ АТ к вирусу гриппа А/Н1N1/ν у женщин, привитых во II триместре, была ниже ($49,12 \pm 0,29$), чем у лиц, вакцинированных в III триместре беременности ($60,99 \pm 0,25$) ($p < 0,05$). Во все последующие периоды наблюдения данный показатель у беременных не имел различий по триместрам.

У беременных, привитых в III триместре гестации (группа II), через 3 месяца после вакцинации и на протяжении всех последующих периодов контроля СГТ АТ к вирусу гриппа В определялась в меньших значениях, чем у небеременных женщин (табл. 3) ($p < 0,05$). Аналогичная закономерность регистрировалась у женщин I и II групп ко всем вакцинным штаммам вируса гриппа через 12 и 9 месяцев после вакцинации, соответственно, по сравнению с III группой ($p < 0,05$).

Обсуждение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодные эпидемии гриппа в мире сопровождаются развитием 3–5 млн случаев тяжелых форм заболевания и до 500 случаев смерти. В России, несмотря на постепенное снижение заболеваемости острыми респираторными инфекциями (ОРИ) и гриппом в последние годы, указанный показатель продолжает оставаться достаточно высоким. В настоящее время нет четких данных по заболеваемости гриппом беременных женщин. На основании проведенных эпидемиологических исследований специалисты ВОЗ включили беременных в группу риска развития тяжелого и осложненного течения гриппа. Работы российских ученых показали, что у беременных инфекция, вызванная вирусом гриппа А/California/7/2009/Н1N1/ν, часто протекала в тяжелой форме и сопровождалась развитием вирусно-бактериальной пневмонии средней (62,5%) и тяжелой (37,5%) степени, а также респираторного дистресс-синдрома легких (25%) [12]. Анализ раннего неонатального периода детей, рожденных матерями, перенесшими ОРИ во время беременности в период пандемии гриппа

А/Н1N1/ν-2009, показал более частую регистрацию нарушений адаптации, чем в группе младенцев здоровых женщин: у каждого второго ребенка была выявлена церебральная ишемия I степени, у каждого четвертого — II степени, гипербилирубинемия; врожденные пороки развития среди новорожденных от матерей, перенесших ОРИ во II триместре гестации, составили 5,1% случаев — 7 детей, из них 2 ребенка имели летальные пороки [11]. Таким образом, признанная во всем мире вакцинопрофилактика гриппа у беременных является безальтернативным методом защиты от данного заболевания, а также способствует снижению частоты возникновения возможных тяжелых осложнений инфекции.

Проведение впервые в России вакцинации беременных против гриппа диктовало необходимость оценки ее безопасности и иммунологической эффективности. Для иммунизации использовалась полимер-субъединичная иммуноадьювантная вакцина, которая ранее не применялась, соответственно не было изучено ее влияние на течение беременности, родов, состояние плода и новорожденного, а также формирование поствакцинального иммунитета. В предыдущих исследованиях было показано, что частота развития местных и системных реакций у беременных при применении субъединичной иммуноадьювантной вакцины не отличается от таковой у беременных из группы плацебо, а также небеременных женщин и не влияет на физиологическое развитие плода и новорожденного [4, 18, 19, 20, 21].

Из литературных источников известно, что у женщин во время беременности наблюдается транзиторная иммуносупрессия с подавлением Т-клеточного иммунного ответа (Th1, Th17, Т-киллеры), снижением функциональной активности NK/NKT-клеток, в связи с этим возникли вопросы: способна ли беременная женщина в ответ на введение вакцины синтезировать то же количество специфических антител к штаммам вируса гриппа, что и небеременная, и эффективна ли вакцинация во II и III триместрах беременности с использованием нового, ранее не изученного вакцинного препарата. При исследовании исходного уровня антител было отмечено, что часть беременных уже имели условно защитный титр IgG-антител к штаммам вируса гриппа, что могло быть связано с перенесенной до беременности инфекцией. В первые месяцы после вакцинации иммунный ответ у женщин, привитых трехвалентной иммуноадьювантной вакциной на разных сроках беременности, не отличался от такового у небеременных,

и полностью отвечал всем критериям СРМР. Со временем, после рождения ребенка, у женщин наблюдалось более выраженное снижение уровня серопротекции, в особенности к штамму гриппа А/Н1N1/v, по сравнению с группой контроля. Через 12 месяцев после вакцинации скорость регрессии уровня серопротекции в группах вакцинированных беременных с учетом срока гестации составляла: 1,6–1,7 (А/Н1N1/v), 1,4 (А/Н3N2) и 1,5–1,6 (В) раза, в то время как у небеременных женщин этот показатель был ниже: 1,2 (А/Н1N1/v), 1,2 (А/Н3N2) и 1,4 (В) раза. Данная закономерность подтверждалась уменьшением значений СГТ АТ в динамике последних месяцев наблюдения. Это может быть связано с множеством факторов, способствующих развитию иммуносупрессии беременных, таких как изменение общего гормонального фона, повышение уровня прогестерона, β_2 -микроглобулина, альфа-фетопротеина и др. Тем не менее, по-

казано, что введение вакцины во II и III триместрах беременности сопровождается синтезом специфических антител в протективных значениях, которые соответствуют общепризнанным критериям СРМР. Этим подтверждается международный опыт по эффективности и безопасности вакцинации против гриппа беременных, в том числе с использованием отечественной субъединичной иммуноадьювантной вакцины, регламентированное Национальным календарем профилактических прививок РФ 2014 г. [3, 7, 16, 17].

Благодарности

Авторы выражают благодарность главному врачу ГУЗ «Ульяновской областной детской клинической больницы им. Ю.Ф. Горячева», заслуженному врачу Российской Федерации А.М. Лебедевко за помощь в организации исследования.

Список литературы/References

1. Андреева Н.П., Петрова Т.И., Костинов М.П. Влияние активной иммунизации против гриппа и пневмококковой инфекции у детей с бронхиальной астмой на течение заболевания и микробный спектр мокроты // Российский аллергологический журнал. 2006. № 5. С. 31–35. [Andreeva N.P., Petrova T.I., Kostinov M.P. Effects of active immunization against influenza and pneumococcal infection in children with bronchial asthma on the course of disease and microbial spectrum of sputum. *Rossiiskii allergologicheskii zhurnal = Russian Allergological Journal*, 2006, no. 5, pp. 31–35. (In Russ.)]
2. Андреева Н.П., Петрова Т.И., Костинов М.П. Клиническая эффективность профилактики гриппа у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания // Медицинская иммунология. 2011. Т. 13, № 4–5. С. 348–349. [Andreeva N.P., Petrova T.I., Kostinov M.P. Clinical effectiveness of prevention of influenza in children with allergic respiratory diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2011, vol. 13, no. 4–5, pp. 348–349. (In Russ.)]
3. Зверев В.В., Костинов М.П., Черданцев А.П., Кусельман А.И., Киселев О.И., Ерофеева М.К., Краснопольский В.И., Новикова С.В., Серова О.Ф., Брико Н.И., Чучалин А.Г. Вакцинация беременных против гриппа: федеральные клинические рекомендации. Н. Новгород: Ремедиум Приволжье, 2015. 42 с. [Zverev V.V., Kostinov M.P., Cherdantsev A.P., Kuselman A.I., Kiselev O.I., Erofeeva M.K., Krasnopol'skiy V.I., Novikov S.V., Serova O.F., Briko N.I., Chuchalin A.G. Vaksinat'siya beremennykh protiv grippa: federal'nye klinicheskie rekomendatsii [Vaccination of pregnant women against influenza: federal guidelines]. *N. Novgorod: Remedium Privolzhje*, 2015, 42 p.]
4. Костинов М.П., Черданцев А.П., Сависько А.А., Тарбаева Д.А., Соловьева И.Л. Истинные и ложные реакции у беременных на введение вакцины против гриппа // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2011. Т. 10, № 6. С. 44–48. [Kostinov M.P., Cherdantsev A.P., Savisko A.A., Tarbaeva D.A., Solovieva I.L. True and false responses in pregnant women to the vaccine against influenza. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 44–48. (In Russ.)]
5. Лусс Л.В., Костинов М.П. Проблемы терапии и профилактики гриппа: мифы об опасностях поствакцинальных реакций, результаты анализа поствакцинальных осложнений после прививки против гриппа у детей Пермского края // Иммунология. 2009. № 1. С. 13–21. [Luss L.V., Kostinov M.P. Problems of therapy and prevention of influenza: myths of the threats of post-vaccination reactions, results of analysis of post-vaccination complications after vaccination against influenza in children, residents of the Perm region. *Immunologiya = Immunology*, 2009, no. 1, pp. 13–21. (In Russ.)]
6. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Костинов М.П. Эффективность и безопасность вакцины «Гриппол®плюс» у разных контингентов // Педиатрия. 2010. № 3. С. 25–28. [Nekrasov A.V., Puchkova N.G., Kostinov M.P. Efficiency and safety of the vaccine «Grippol®plus» from different contingents. *Pediatriya = Pediatrics*, 2010, no. 3, pp. 25–28. (In Russ.)]
7. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 125н от 21.03.2014. М., 2014. 9 с. [Ob utverzhdenii natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok i kalendarya profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam: prikaz Ministerstva zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii № 125n ot 21.03.2014. [Approval of national preventive vaccination calendar and vaccination calendar epidemic indications: Russian Federation Ministry of Health order No. 125 (21.03.2014)]. *Moscow*, 2014. 9 p.]
8. Протасов А.Д., Чебыкина А.В., Костинов М.П., Жестков А.В., Чучалин А.Г. Является ли комбинированная вакцинация против респираторных инфекций положительным фактором в изменении функционального статуса

- у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких? // Пульмонология. 2014. № 6. С. 49–55. [Protasov A.D., Chebykina A.V., Kostinov M.P., Zhestkov A.V., Chuchalin A.G. Does a combined vaccine against respiratory infection contribute to functional improvement in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2014, no. 6, pp. 49–55. doi: 10.18093/0869-0189-2014-0-6-49-55 (In Russ.)]
9. Рекомендации по организации и проведению вакцинации беременных и родильниц против гриппа А (H1N1): информ. письмо № 15-4/3108-07 от 11 декабря 2009 г. [Rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu vaksinatcii beremennykh i rodil'nits protiv grippa A (H1N1): inform. pis'mo № 15-4/3108-07 ot 11 dekabrya 2009 g. [Recommendations on organizing and conducting vaccination of pregnant and postpartum women against influenza A (H1N1): inform. letter no. 15-4/3108-07 of December 11, 2009]. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/7577-informatsionnoe-pismo-15-4-3108-07-ot-11-dekabrya-2009-g> (06.04.2017)
 10. Скочилова Т.В., Воробьева В.А., Костинов М.П., Тарасова А.А., Коровкина Т.И., Юшкова И.Ю., Лукачев И.В. Вакцинация против пневмококковой и гриппозной инфекций у детей и подростков с сахарным диабетом 1-го типа // Проблемы эндокринологии. 2009. Т. 55, № 4. С. 6–10. [Skochilova T.V., Vorobyov V.A., Kostinov M.P., Tarasova A.A., Korovkina T.I., Yushkova I.Yu., Lukachev I.V. Vaccination against pneumococcal and influenza infections in children and adolescents with diabetes of the 1st type. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2009, vol. 55, no 4. pp. 6–10. (In Russ.)]
 11. Тарбаева Д.А., Костинов М.П., Загородняя Э.Д., Иозефсон С.А., Черданцев А.П. Акушерские и перинатальные исходы беременности, осложненной острой респираторной инфекцией во втором триместре гестации // Акушерство и гинекология. 2012. № 2. С. 67–71. [Tarbaeva D.A., Kostinov M.P., Zagorodnyaya E.D., Josephson S.A., Cherdantsev A.P. Obstetric and perinatal outcomes of pregnancies complicated with acute respiratory infection during the second trimester of gestation. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2012, no. 2, pp. 67–71. (In Russ.)]
 12. Тарбаева Д.А., Костинов М.П., Иозефсон С.А., Загородняя Э.Д. Клиническое течение и исходы гриппа А (H1N1) 2009 у беременных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 4. С. 71–76. [Tarbaeva D.A., Kostinov M.P., Josephson S.A., Zagorodnyaya E.D. Clinical course and outcomes of influenza A (H1N1) 2009 in pregnant women. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 71–76. (In Russ.)]
 13. Тарасова А.А., Колбасина Е.В., Лукушкина Е.Ф., Кузмичев Ю.Г., Костинов М.П. Иммуногенность и безопасность трехвалентной иммуноадьювантной субъединичной противогриппозной вакцины у детей с сахарным диабетом 2-го типа: результаты проспективного сравнительного исследования // Вопросы современной педиатрии. 2016. Т. 15, № 5. С. 489–497. [Tarasova A.A., Kolbasina E.V., Lukushkina E.F., Kuzmichev Yu.G., Kostinov M.P. Immunogenicity and safety of a trivalent subunit immunoadjuvant influenza vaccine in children with type 1 diabetes: results of a prospective comparative study. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2016, vol. 15, no. 5, p. 489–497. doi: 10.15690/vsp.v15i5.162 (In Russ.)]
 14. Чебыкина А.В., Костинов М.П. Поствакцинальный иммунитет против гриппа у пациентов с хронической бронхолегочной патологией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 4. С. 76–80. [Chebykina A.V., Kostinov M.P. Postvaccination immunity against influenza in patients with chronic broncho-pulmonary pathology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 76–80. (In Russ.)]
 15. Чебыкина А.В., Костинов М.П., Магаршак О.О. Оценка безопасности и эффективности вакцинации против гриппа пациентов с хроническим обструктивным синдромом // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. Т. 55, № 6. С. 50–53. [Chebykina A.V., Kostinov M.P., Magarshak O.O. Estimation of safety and efficiency of vaccination from a flu at patients with chronic obstructive lung syndrome. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2010, vol. 55, no. 6, pp. 50–53. (In Russ.)]
 16. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И. Вакцинопрофилактика гриппа у беременных: руководство для врачей. М.: 4МПресс, 2013. 96 с. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Vaksinoprofilaktika grippa u beremennykh: rukovodstvo dlya vrachei [Influenza vaccination in pregnant women: guide for physicians]. Moscow: 4MPress, 2013. 96 p.]
 17. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И. Вакцинопрофилактика гриппа у беременных: руководство для врачей. Изд. 2-е, доп. М.: Группа МДВ, Арт-студия «Созвездие», 2014. 112 с. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Vaksinoprofilaktika grippa u beremennykh: rukovodstvo dlya vrachei [Influenza vaccination in pregnant women: guide for physicians]. Moscow: MDV Group, Art-Studio Sozvezdie, 2014. 112 p.]
 18. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И., Вознесенская Н.В. Вакцинация беременных против гриппа А(H1N1) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 4. С. 46–50. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I., Voznesenskaya N.V. Vaccination of pregnant women against influenza A(H1N1). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 46–50. (In Russ.)]
 19. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И., Лютая З.А., Кутбудинова М.Х. Анализ ante- и постнатального развития детей на фоне вакцинации беременных против гриппа // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2013. Т. 58, № 2. С. 30–34. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I., Lyutaya Z.A., Kutbitdinov M.H. Analysis of ante- and postnatal fetal development after influenza vaccination of pregnant women. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 30–34. (In Russ.)]
 20. Черданцев А.П., Кусельман А.И., Костинов М.П., Лютая З.А., Дерябина Е.В., Азизова Р.Ш., Мельник Р.Х. Развитие в постнатальном периоде детей, рожденных от вакцинированных против гриппа беременных // Ульяновский медико-биологический журнал. 2012. № 3. С. 80–84. [Cherdantsev A.P., Kuselman I.A., Kostinov M.P., Lyutaya Z.A., Deryabina E.V., Azizova R.S., Miller R.H. Development in the postnatal period of children born to vaccinated against influenza in pregnant women. *Ul'yanovskii mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk Medical and Biological Journal*, 2012, no. 3, pp. 80–84. (In Russ.)]

21. Черданцев А.П., Кусельман А.И., Синицына М.Н., Шалагина М.Е., Костинов М.П., Тарбаева Д.А. Изучение клинической безопасности вакцинации против гриппа у беременных // Медицинский альманах. 2011. Т. 17, № 4. С. 120–122. [Cherdantsev A.P., Kuselman A.I., Sinitsyn M.N., Shalagina M.E., Kostinov M.P., Tarbaeva D.A. Clinical study of the safety of vaccination against influenza in pregnant women. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2011, vol. 17, no. 4, pp. 120–122. (In Russ.)]
22. Protasov A.D., Kostinov M.P., Zhestkov A.V., Shteyner M.L., Kazharova S.V., Tezikov Y.V., Lipatov I.S. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): clinical and immunological effects of mono-vaccination against influenza using an immunoadjuvant vaccine of a new class versus combined administration *S. pneumoniae*, H. influenza and influenza vaccines. In: Steps forwards in diagnosing and controlling influenza: ed. by M.M. Daddour. *InTech*, 2016, pp. 239–253. doi: 10.5772/61910

Авторы:

Костинов М.П., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Черданцев А.П., д.м.н., профессор кафедры педиатрии ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия;

Шмитко А.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Праилова Д.А., аспирант Национального НПЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия;

Протасов А.Д., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, Самара, Россия;

Дагиль Ю.А., аспирант Института иммунологии ФМБА России, Москва, Россия;

Костинова Т.А., младший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Ахматова Н.К., д.м.н., профессор, зав. лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Хромова Е.А., аспирант лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Рыжов А.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Благовидов Д.А., аспирант лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Полищук В.Б., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Магаршак О.О., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Коровкина Е.С., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russian Federation, Head of the Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Cherdantsev A.P., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Pediatrics, Ulyanovsk State University, Ministry of Health of Russia, Ulyanovsk, Russian Federation;

Shmitko A.D., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Praulova D.A., PhD Student, Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation;

Protasov A.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russia.

Dagil U.A., PhD Student, Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation;

Kostinova T.A., Junior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Akhmatova N.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Chromova E.A., PhD Student, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Ryzhov A.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Blagovidov D.A., PhD Student, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Polishchuk V.B., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Magarshak O.O., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Korovkina E.S., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.02.2017
Отправлена на доработку 06.03.2017
Принята к печати 19.04.2017

Received 03.02.2017
Revision received 06.03.2017
Accepted 19.04.2017

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТОВ *IN VITRO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОТИВОЧУМНОГО ИММУНИТЕТА

А.Н. Куличенко, Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Изучена возможность оценки поствакцинального противочумного иммунитета с использованием антигенстимулированных клеточных тестов *in vitro* и цитометрического анализа. Объект исследования — образцы крови 17 человек, иммунизированных подкожно вакциной чумной живой из штамма *Yersinia pestis* EV. Взятие крови осуществляли: до вакцинации и после иммунизации на 7 и 21 сутки, через 3 и 6 месяцев. Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов выявляли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя маркеры ранней (CD45⁺CD3⁺CD25⁺) и поздней (CD45⁺CD3⁺HLA-DR⁺) активации лимфоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии. В качестве антигенов испытывали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба и аллерген — пестин ПП. Установлен высокий стимулирующий потенциал у комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis*. Показано, что коэффициент стимуляции относительного содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к IL-2, после вакцинации во все сроки наблюдения был положительный, при этом наибольших значений он достигал на 21 сутки (56,37%) и через 3 месяца (47,41%). При выявлении HLA-DR-позитивных лимфоцитов до вакцинации, на 7 и 21 сутки отмечается отрицательный коэффициент стимуляции, через 3 и 6 месяцев коэффициент стимуляции был положительный. Анализ динамики интенсивности экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов показал возможность и перспективу применения клеточных тестов *in vitro* для лабораторной оценки специфической реактивности клеточного иммунитета как на ранних (7 суток), так и поздних (6 месяцев) сроках после вакцинации. Полученные результаты могут быть основанием для разработки нового алгоритма оценки иммунологической эффективности вакцинации контингентов против чумы, основанного на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции антигеном в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: специфическая профилактика чумы, клеточный иммунитет, оценка эффективности вакцинации, маркеры активации лимфоцитов, антигены *Yersinia pestis*, коэффициент стимуляции.

THE ANTIGEN-SPECIFIC CELL *IN VITRO* TESTS FOR POST-VACCINATION ANTIPLAGUE IMMUNITY FORMATION

Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V.

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The possibility of post-vaccination anti-plague immunity evaluation was researched using antigen-stimulated cells tests *in vitro* and cytometry analysis. The object of study — the blood samples of 17 people immunised by the live

Адрес для переписки:

Гостищева Светлана Евгеньевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел./факс: +7 (8652) 26-20-50 (служебн.).
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Contacts:

Svetlana E. Gostischeva
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone/fax: +7 (8652) 26-20-50 (office).
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Библиографическое описание:

Куличенко А.Н., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208

Citation:

Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V. Using the antigen-specific cell *in vitro* tests to assess the formation of post-vaccination immunity antiplague // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208

plague vaccine (*Yersinia pestis* EV) epicutaneously. Blood taking was carried out before vaccination and after immunisation on 7 and on 21 days, in 3 and in 6 months. Intensity antigen reactivity of lymphocytes was detected by cell tests *in vitro*, analysing markers of early (CD45⁺CD3⁺CD25⁺) and late (CD45⁺CD3⁺HLA-DR⁺) lymphocyte activation using flow cytometry. The complex of water-soluble *Y. pestis* antigens and allergen — pestin PP was tested as antigen. The high stimulating potential was defined of the water-soluble antigens *Y. pestis* complex. It is shown that coefficient of stimulation of relative level T- lymphocytes which express receptors for IL-2 was positive for all observation times after immunisation. The coefficient of stimulation had maximum values at 21 days (56.37%) and at 3 (47.41%) months. In identifying HLA-DR-positive lymphocytes before vaccination, the negative coefficient of stimulation was indicated on 7 and 21 days and the positive coefficient of stimulation was indicated at 3 and at 6 months. Analysis of intensity expression of early and late lymphocyte activation markers dynamics showed the possibility and prospect of application of cellular *in vitro* tests for the laboratory evaluation of specific reactivity of cellular immunity in both the early (7 days) and late (6 months) periods after vaccination. The results can be the basis for developing a new algorithm for assessment of immunological effectiveness of vaccination people against plague. It is the algorithm based on the identification of lymphocyte activation markers by antigen stimulation in conditions *in vitro*.

Key words: specific plague prevention, cellular immunity, evaluation of the effectiveness of vaccination, lymphocyte activation markers, *Yersinia pestis* antigens, stimulating coefficient.

В последние годы в Российской Федерации сохраняется нестабильная эпизоотологическая ситуация в природных очагах чумы, при этом наиболее сложная эпидемиологическая обстановка сложилась на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага, где в 2014, 2015 и 2016 гг. зарегистрированы случаи заболевания чумой человека. Заболевший чумой в августе 2015 г. человек был привит против чумы (в апреле 2015 г.) [2, 8, 10]. Данный факт актуализирует проблему оценки иммунологической и эпидемиологической эффективности мероприятий по специфической профилактике чумы, важнейший аспект которой — определение сроков формирования и сохранения поствакцинального иммунитета у вакцинированного контингента. Нормативная база федерального уровня, регламентирующая оценку уровня противочумного иммунитета у людей, к настоящему времени отсутствует.

В лабораторной практике используется метод определения эффективности иммунизации против чумы по показателям поствакцинальных титров антител к F1 чумного микроба. Однако имеются данные, что лишь у 35–80% иммунизированного против чумы контингента формируется поствакцинальная сероконверсия [7].

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в образовании и реализации противочумного иммунитета, серологические реакции только косвенно могут указывать на наличие или отсутствие специфической резистентности организма к чуме [2, 11, 12, 13].

В 70–80-е гг. прошлого столетия было установлено, что кожно-аллергическая реакция на антигены чумного микроба может служить объективным показателем развития иммунитета организма к инфекции. Кожный аллергологический тест опосредован реакцией гиперчувствительности замедленного типа, реализуемой CD4⁺ лимфоцитами 1-го типа и их цитокинами, соответственно он отражает специфическую активность клеточного иммунитета [3, 5, 6, 13].

Несмотря на достаточно высокую специфичность (более 90%) кожно-аллергических реакций для определения поствакцинального иммунитета к чуме, тесты *in vivo* широкого внедрения так и не получили. Основной причиной этого стал высокий риск формирования общих и местных побочных реакций на парентеральное введение аллергена.

Бесперспективность инвазивных методов оценки клеточного противочумного иммунитета определила актуальность дальнейших исследований, которые были направлены на поиск информативных иммунологических маркеров, позволяющих *in vitro* определить их наличие и уровень активности. С этой целью для исследования поствакцинального противочумного иммунитета был рекомендован тест повреждения нейтрофилов (ППН), основу которого составляла оценка амебоидной активности и повреждаемости нейтрофилов крови сенсibilизированных лиц после взаимодействия со специфическим аллергеном. Предпринимались попытки выявлять противочумный иммунитет в реакции дегрануляции гранулоцитов под влиянием аллергена чумного микроба (микробного пестина). Для определения антигенреактивности сенсibilизированных лимфоцитов также использовали показатели пролиферативной, цитокинпродуцирующей активности, экспрессии активационных молекул при контакте с основными антигенами *Yersinia pestis* (капсульный антиген, мышинный токсин, ЛПС, ОСА, пестин) [4, 7, 11].

Несмотря на многочисленные исследования в данной области, метод количественной оценки клеточного противочумного иммунитета, который бы четко коррелировал с формированием специфического иммунитета к возбудителю чумы, так и не предложен.

Таким образом, совершенствование методов лабораторной оценки эффективности специфической профилактики чумы — актуальная задача, решение которой позволит разработать

эффективный инструмент иммунологического мониторинга контингентов профессионального риска, подлежащих вакцинации.

Цель исследований — изучение возможности оценки поствакцинального противочумного иммунитета с использованием антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* и технологии цитометрического анализа.

Материалы и методы

Объект исследования — образцы крови 17 человек, иммунизированных подкожно вакциной чумной живой из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Обследуемый контингент подлежал ежегодной иммунизации против чумы по эпидемическим показаниям. Взятие крови осуществляли в следующие сроки: до вакцинации, на 7 и 21 сутки, через 3 и 6 месяцев (срок наблюдения) после иммунизации.

Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов выявляли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя маркеры ранней (CD45⁺CD3⁺CD25⁺) и поздней (CD45⁺CD3⁺HLA-DR⁺) активации лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США).

Коэффициент стимуляции (КС) рассчитывали по формуле [4]: $КС = (C-D)/C \times 100$, где КС — коэффициент стимуляции лимфоцитов в условиях *in vitro* (в %); С — относительный (абсолютный) уровень содержания в крови популяций (субпопуляций) лимфоцитов в опытной пробе; D — относительный (абсолютный) уровень в крови популяций (субпопуляций) лимфоцитов в контрольной пробе.

В качестве антигенов использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба (ВрАг), приготовленный по методике Е.Н. Афанасьева [1] и аллерген — пестин ПП, полученный по методу, предложенному Т.М. Тараненко [9]. В контрольной пробе с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов, клетки обрабатывали стерильным 0,9% изотоническим раствором натрия хлорида.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Антиген CD25 — высокоаффинный рецептор интерлейкина 2 (IL-2R α), который экспрессируется активированными Т-лимфоцитами, в меньшей степени В-клетками. Наличие на поверхности лимфоцитов CD25 указывает на их раннюю

активацию, основная часть не активированных Т-клеток иммунологической памяти у человека конститутивно экспрессирует CD25.

Анализ количества CD25-позитивных лимфоцитов у обследуемых до вакцинации, вне зависимости от применяемого антигена, свидетельствовал об отсутствии статистически достоверной разницы значений показателя в группах сравнения. Так, при инкубации с 0,9% раствором натрия хлорида количество CD45⁺CD3⁺CD25⁺ лимфоцитов в среднем составило — 12,12 \pm 1,22%, при *in vitro* активации ВрАг вакцинного штамма *Y. pestis* EV — 14,15 \pm 1,04%, при стимуляции пестином — 14,90 \pm 0,97%.

Во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано. Количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации при воздействии 0,9% раствором натрия хлорида на 7, 21 сутки через 3 и 6 месяцев после иммунизации в среднем фоновый уровень составил 12,94 \pm 1,58%.

При активации клеток ВрАг уже на 7 сутки отмечается статистически достоверное повышение (на 46,7%) интенсивности экспрессии лимфоцитами рецептора к IL-2R α (CD25) до 19,39 \pm 2,19% ($p \leq 0,05$). К 21 суткам исследуемый показатель имел двукратное увеличение, по сравнению с значением до вакцинации, составив в среднем 27,92 \pm 1,82% ($p \leq 0,05$). Через 3 и 6 месяцев после введения вакцины наблюдалась тенденция к снижению количества CD25-позитивных лимфоцитов относительно предыдущего срока обследования, в среднем до 24,30 \pm 1,88% и 22,72 \pm 2,75% ($p \leq 0,05$), при этом количество специфически активированных лимфоцитов в сравнении с контрольными данными остается выше на 90,1 и 66,4% соответственно.

Анализ применения аллергена пестина для специфической активации лимфоцитов в условиях *in vitro* показал, что во все периоды исследования — на 7, 21 сутки и через 3 и 6 месяцев после иммунизации количество CD45⁺CD3⁺CD25⁺ лимфоцитов не имело статистически значимой разницы в сравнении с аналогичными данными контроля, составив в среднем 16,60 \pm 0,78, 11,96 \pm 1,57, 14,23 \pm 1,21 и 13,15 \pm 1,64% соответственно (табл. 1).

По данным современной литературы, экспрессия лимфоцитами антигена DR главного комплекса гистосовместимости II класса ассоциирована с поздней и длительной активацией лимфоцитов. HLA-DR⁺ лимфоциты длительно циркулируют в кровотоке, отражая активированное состояние иммунной системы.

Интенсивность экспрессии HLA-DR лимфоцитами у обследуемых до вакцинации при инкубации с изотоническим раствором и стимуляции специфическими антигенами *Y. pestis* составила: 0,9% раствором натрия хлорида — 23,02 \pm 2,48%, ВрАг — 22,44 \pm 2,31%, пестином — 20,36 \pm 1,86%, при этом количественные различия статистически не значимы.

Таблица 1. Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (CD25⁺), %Table 1. Quantity of specifically activated T-lymphocytes (CD25⁺), %

Сроки обследования Terms of inspection	Стимулирующий антиген Stimulating antigen		Контроль (0,9% р-р NaCl) Control (0,9% solution of NaCl)
	ВрАг WsAg	Пестин Pestis	
До вакцинации Before vaccination	14,15±1,04	14,90±0,97	12,12±1,22
Через 7 сут после вакцинации 7 days after vaccination	19,39±2,19	16,60±0,78	13,18±1,47
Через 21 сут после вакцинации 21 days after vaccination	27,92±1,82	11,96±1,57	12,18±1,38
Через 3 мес после вакцинации 3 months after vaccination	24,30±1,88	14,23±1,21	12,78±1,10
Через 6 мес после вакцинации 6 months after vaccination	22,72±2,75	13,15±1,64	13,64±1,72

Во все сроки исследования спонтанного усиления экспрессии лимфоцитами антигена DR не установлено. На 7, 21 сутки и через 3 и 6 месяцев после иммунизации количество HLA-DR⁺ лимфоцитов после инкубации с 0,9% раствором натрия хлорида (контроль) составило 16,99±0,91, 29,05±2,81, 27,32±2,98 и 16,50±1,63% соответственно.

При активации лимфоцитов *in vitro* ВрАг на 7, 21 сутки и через 3 месяца после вакцинации не выявлено статистически значимой разницы в значениях интенсивности экспрессии маркера поздней активации в сравнении с контролем. Так, на 7 сутки количество HLA-DR⁺ лимфоцитов составило в среднем 15,82±1,35%, на 21 сутки — 28,45±1,92%, а через 3 месяца — 27,81±2,56%. Однако при обследовании вакцинированных через 6 месяцев после иммунизации установлено достоверное повышение интенсивности экспрессии антигена DR на 42,1% составившее в среднем 23,45±2,71% ($p < 0,05$), при этом у двух вакцинированных (11,8%) этот показатель был выше контрольных значений в 2 раза.

При анализе интенсивности экспрессии рецептора HLA-DR лимфоцитами при стимуляции пестином статистически достоверных различий по сравнению с контрольными значениями во все сроки обследования не выявлено (табл. 2).

Анализ стимулирующего потенциала комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* относительно активации сенсibilизированных лимфоцитов в условиях *in vitro* показал, что коэффициент стимуляции относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD45⁺CD3⁺CD25⁺ во все сроки наблюдения был положительный, при этом наибольших значений он достигал на 21 сутки (56,37%) и через 3 месяца (47,41%) после иммунизации. При выявлении CD45⁺CD3⁺HLA-DR⁺ клеток до вакцинации, на 7 и 21 сутки отмечаются отрицательные коэффициенты стимуляции, затем через 3 и 6 месяцев коэффициент стимуляции становится положительным (рис.).

Таким образом, наибольшим стимулирующим потенциалом *in vitro* в отношении иммунных лимфоцитов обладает комплекс водорас-

Таблица 2. Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺), %Table 2. Number of specifically activated T-lymphocytes (HLA-DR⁺), %

Сроки обследования Terms of inspection	Стимулирующий антиген Stimulating antigen		Контроль (0,9% р-р NaCl) Control (0,9% solution of NaCl)
	ВрАг WsAg	Пестин Pestis	
До вакцинации Before vaccination	22,44±2,31	20,36±1,86	23,02±2,48
Через 7 сут после вакцинации 7 days after vaccination	15,82±1,35	18,88±4,31	16,99±0,91
Через 21 сут после вакцинации 21 days after vaccination	28,45±1,92	31,01±2,81	29,05±2,81
Через 3 мес после вакцинации 3 months after vaccination	27,81±2,56	30,44±3,11	27,32±2,98
Через 6 мес после вакцинации 6 months after vaccination	23,45±2,71	15,60±1,81	16,50±1,63

творимых антигенов *Y. pestis*, при этом максимум клеточной антигенспецифической активности (по маркеру CD25) приходится на 21 сутки после введения вакцины.

Динамика интенсивности экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов показала возможность и перспективу применения описанного методического подхода для лабораторной оценки формирования поствакцинального иммунитета (или фактической привитости) у вакцинированных на ранних (7 суток) и поздних (6 месяцев) сроках после вакцинации. При этом наиболее информативным показателем активности клеточного адаптивного иммунитета против возбудителя чумы можно считать антиген-стимулированную экспрессию Т-лимфоцитами маркера CD25 (рецептор к IL-2).

С учетом ключевой роли клеточного иммунитета при чуме, использование антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* и технологии цитометрического анализа открывает возможность количественно определять поствакцинальную специфическую антигенреактивность лимфоцитов в отношении *Y. pestis*. Полученные результаты могут быть основанием для разработки нового метода количественной оценки иммунологической эффективности вакцинации против чумы по эпидемиологическим показаниям, основанного на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном.

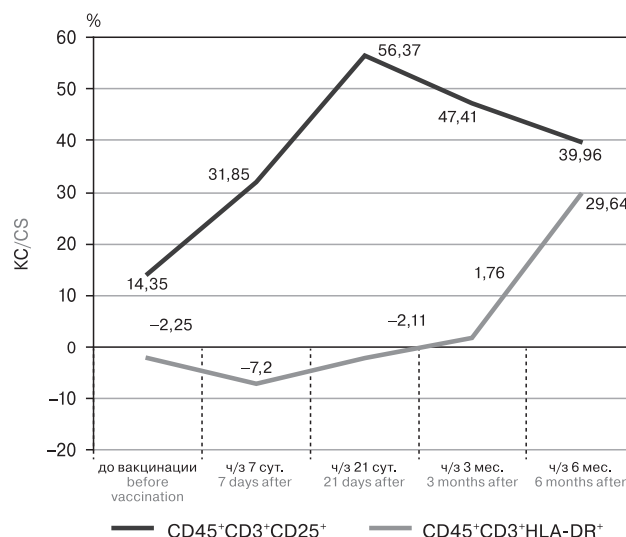


Рисунок. Динамика значений КС лимфоцитов крови людей, вакцинированных против чумы, при *in vitro* активации ВpAg

Figure. Blood lymphocytes CS values dynamics in vaccinated against plague patients, with *in vitro* activation of WsAg

В плане продолжения исследований — определение динамики изменения изученных показателей и коэффициента стимуляции в более поздние сроки (до 1 года).

Список литературы/References

- Афанасьев Е.Н., Таран И.Ф., Тюменцева И.С. Антигенная структура бруцелл. Сообщение I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл. Ставрополь, 1986. 16 с. [Afanasiev E.N., Taran I.F., Tyumentseva I.S. Antigenная структура brutsell. Soobshchenie I. Sravnitel'naya otsenka metodov vydeleniya vodorastvorimyykh antigenov brutsell [Antigenic structure of Brucella. Report I. Comparative evaluation of methods for the isolation of Brucella water-soluble antigens]. *Stavropol*, 1986. 16 p.]
- Балахонов С.В. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение I. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 1. С. 55–60. [Balakhonov S.V. The case of human plague in Kosh-Agach district of the Altai Republic in 2015. Report I. Clinical, epidemiological and epizootological aspects. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016. no. 1, pp. 55–60. (In Russ.)]
- Белобородов Р.А., Тараненко Т.М., Бахрах Е.Э., Муравьева Н.К., Дудкова В.К. Эффективность компонентов пестина ПП при определении корреляции аллергической реактивности и приобретенной резистентности к чуме // Проблемы особо опасных инфекций. 1974. № 6 (40). С. 51–54. [Beloborodov R.A., Taranenko T.M., Bachrach E.E., Muravieva N.K., Dudkova V.K. Efficiency pestina PP components in determining the correlation of allergic reactivity and acquired resistance to the plague. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1974, no. 6 (40), pp. 51–54. (In Russ.)]
- Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуорометрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 11. С. 48–53. [Bogacheva N.V., Kryuchkov A.V., Darmov I.V., Vorobiev K.A., Petchenkin D.V., Elagin G.D., Kolesnikov D.P. Experimental evaluation using flow cytofluorometry level cell immunological memory in individuals vaccinated against plague and anthrax. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 11, pp. 48–53. (In Russ.)]
- Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 205 с. [Korobkova E.I. Zhivaya protivochumnaya vaktstina [Live plague vaccine]. M.: Medgiz, 1956. 205 p.]
- Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 107. С. 77–80. [Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Schukovskaya T.N. Effect of anti-plague vaccination in the functional activity of the human innate immune cells. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 107, pp. 77–80. (In Russ.)]
- Ляпина А.М., Федорова В.А., Хижнякова М.А., Телепнев М.В., Мотин В.Л. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей // Медицинский

- академический журнал. 2012. Т. 12, № 3. С. 85–87. [Lyapina A.M., Fedorova V.A., Khizhnyakova M.A., Telepnev M.V., Motin V.L. Recombinant polypeptide biomarkers assess immunological effectiveness of vaccination of live plague vaccine in humans. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 85–87. (In Russ.)]
8. Попова А.Ю., Кутырев В.В., Балахонов С.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Попов Н.В., Косилко С.А., Дубровина В.И., Корзунов В.М., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Бугоркова С.А., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Топорков В.П., Лудский А.А., Раздорский А.С., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Лопатин А.А., Щербакова С.А. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 4. С. 5–10. [Popova A.Yu., Kutuyev V.V., Balakhonov S.V., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakschina N.D., Shchuchinov L.V., Popov N.V., Kosilko S.A., Dubrovina V.I., Korzunov V.M., Mikhailov E.P., Mishchenkova A.I., Denisov A.V., Rozhdestvenskii E.N., Bugorkova S.A., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Toporkov V.P., Ludskii A.A., Razdorskii A.S., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A. Coordination of measures of plague control institutions, aimed at rehabilitation and sanitation of Gorno-Altai high-mountain natural plague focus in 2016. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 4, pp. 5–10. (In Russ.)]
 9. Тараненко Т.М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Исследование пестина методом электрофореза // Проблемы особо опасных инфекций. 1968. № 2. С. 154–157. [Taranenko T.M. Study of the chemical composition of the allergen Pestin PP. Pestin study by electrophoresis. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1968, no. 2, pp. 154–157. (In Russ.)]
 10. Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дятлов И.А. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. 2010. № 103. С. 56–59. [Firstova V.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Zyryina E.V., Ivanov S.A., Kiseleva N.V., Kopylov P.Kh., Anisimov A.P., Dyatlov I.A. Determination of CD69 expression of the early activation marker on the lymphocytes of the immune mice after stimulation with antigens of plague microbe. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2010, no. 103, pp. 56–59. (In Russ.)]
 11. Do Y., Didierlaurent A.M., Ryu S., Koh H., Park C.G., Park S., Perlin D.S., Powell B.S., Steinman R.M. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor. *Vaccine*, 2012, no. 30 (45), pp. 6359–6367. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.051
 12. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. *Infection and Immunity*, 2007, vol. 75, no. 2, pp. 878–885. doi: 10.1128/IAI.01529-06
 13. Rajan T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.*, 2003, vol. 24, no. 7, pp. 376–379. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00142-X

Авторы:

Куличенко А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Абзаева Н.В., к.б.н., зав. научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Гостищева С.Е., научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Ракитина Е.Л., к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Пономаренко Д.Г., к.б.н., зав. лабораторией бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Костюченко М.В., научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия.

Authors:

Kulichenko A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Abzaeva N.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Gostischeva S.E., Researcher, Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Kostuchenko M.V., Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation.

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, кДа и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. 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

Абзаева Н.В.	203	Кафарская Л.И.	162	Преснякова Н.Б.	141
Алешкин В.А.	162	Кондюкова Н.В.	130	Протасов А.Д.	193
Анисенкова Е.В.	141	Коржиков-Влах В.А.	123	Ракитина Е.Л.	203
Антимонова О.И.	123	Коровкина Е.С.	193	Рутковская Н.В.	130
Афанасьев М.С.	162	Костинов Е.П.	193	Рыжов А.А.	193
Афанасьев С.С.	162	Костинова Т.А.	193	Сахабеев Р.Г.	123
Ахматова Н.К.	193	Костюченко М.В.	203	Серебрякова М.К.	151
Барбараш Л.С.	130	Кудрявцев И.В.	151	Синицына Е.С.	123
Барбараш О.Л.	130	Куличенко А.Н.	203	Столбова Ф.С.	171
Басов А.А.	162	Кулова Е.А.	141	Тенникова Т.Б.	123
Бессолицына Е.А.	171	Кутихин А.Г.	130	Ткачук А.П.	151
Благовидов Д.А.	193	Магаршак О.О.	193	Тотолян Арег А.	151
Борисова О.Ю.	162	Максимов Г.В.	151	Уткин О.В.	141
Васильева Е.В.	151	Одаренко Ю.Н.	130	Филатова Е.Н.	141
Вербов В.Н.	151	Орлов А.И.	117	Ходова А.Е.	123
Волков С.А.	171	Осовских В.В.	181	Хромова Е.А.	193
Гостищева С.Е.	203	Пикина А.П.	162	Хуторная М.В.	130
Грудинина Н.А.	123	Пименова А.С.	162	Цвиркун О.В.	162
Дагиль Ю.А.	193	Полищук А.Г.	181	Цепокина А.В.	130
Добровольская О.А.	117	Полищук В.Б.	193	Черданцев А.П.	193
Донских Е.Е.	162	Полухина О.В.	181	Шавловский М.М.	123
Духовлинов И.В.	117	Поляков Д.С.	123	Шамсутдинова О.А.	107
Евтушенко В.И.	181	Понасенко А.В.	130	Шмитько А.Д.	193
Казачек Я.В.	130	Пономаренко Д.Г.	203	Южалин А.Е.	130
Караулов А.В.	162	Праулова Д.А.	193	Якубович Е.И.	181

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

антигены <i>Yersinia pestis</i>	203	нозокомиальные инфекции	181
апоптоз	141	обратная транскрипция	171
ассоциированные вакцины	107	однонуклеотидные полиморфизмы	130
вакцинация беременных	193	оценка эффективности вакцинации	203
вакцинные штаммы	107	полимеразная цепная реакция	162, 171
вакцинопрофилактика	107	полимеразная цепная реакция в режиме	
видовая идентификация	181	реального времени	162
вирус гриппа	117	полиомиелит	107
вирус клещевого энцефалита	171	поствакцинальный иммунный ответ	193
ВИЧ-инфекция	151	предиктивные маркеры	130
гемагглютинин	117	проточная цитометрия	151
грамотрицательные бактерии	181	рекомбинантный белок	117
грипп	193	специфическая профилактика чумы	203
гуморальный иммунный ответ	123	субпопуляции Т-хелперов	151
живые вакцины	107	субъединичная трехвалентная	
заболеваемость	107	иммуноадьювантная вакцина	193
зеленый флуоресцентный белок	123	туберкулез	151
идентификация	171	универсальная вакцина	117
изотермальная амплификация	162	хроматография	117
иксодовые клещи	171	частицы на основе полимолочной	
иммуноадьювантные вакцины	193	кислоты	123
иммуногенность	117	чувствительность бактерий	181
инфекционный мононуклеоз	141	эпидемический паротит	107
инфекционный эндокардит	130	<i>Bordetella pertussis</i>	162
карбапенемазы	181	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	171
клеточный иммунитет	203	CD4	141
клещевой боррелиоз	171	CD8	141
коклюш	162	CD45RA	151
корь	107	CD62L	151
коэффициент стимуляции	203	CD95	141
краснуха	107	С-реактивный белок	130
«ловушки» вирусов	123	DR3	141
маркеры активации лимфоцитов	203	IL-1 β	130
молекулярно-генетическая диагностика	162	IL-12	130
моновакцины	107	MALDI-TOF MS	181
наивные Т-лимфоциты	141	QuantiFERON-TB Gold In-Tube	151