

2017

Выпуск посвящен 95-летию Госсанэпиднадзора РФ



ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

- 
- С 2016 ГОДА ВКЛЮЧЕН В **WEB OF SCIENCE™** (Emerging Sources Citation Index)

ЖУРНАЛ «ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ»

- С 2017 ГОДА ВКЛЮЧЕН В МЕЖДУНАРОДНУЮ БАЗУ **SCOPUS®**

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

июль–сентябрь
2017, том 7

№ 3

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
Брей П. д.б.н., профессор, директор Института Пастера в Лаосе, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней, Вьентьян, Лаос
Гинцбург А.Л. д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Дозо Ч. д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада
Лаврентьева И.Н. д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Лобзин Ю.В. д.м.н., профессор, академик РАН, директор 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 Ангелюффа, зав. отделом инфекционной микробиологии, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, первый заместитель председателя Комитета Государственной Думы по образованию и науке, 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, зам. директора по научной работе ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Тотолян Артем А. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдли И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Хайтов Р.М. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия
Черешнев В.А. д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института иммунологии и физиологии, 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, президент 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, профессор кафедры 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 и вирусологии 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 11.09.2017 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12,5.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1181

© 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)

July–September

2017, volume 7

No. 3

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

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

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

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

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

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

Yuri V. Lobzin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, 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, First Deputy Chairman of the State Duma Committee on Education and Science, 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, Deputy Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

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

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, President, 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, Professor 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 and Virology, 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 11.09.2017. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 12.5.

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

- Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л.*
НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: ПЕРЕОСМЫСЛЕНИЕ СТАРЫХ ДОГМ. ЧАСТЬ 1 219
- Ваганова А.Н.*
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА МИКОПЛАЗМ К ФТОРХИНОЛОНАМ 231

Оригинальные статьи

- Калинина О.В., Личная Е.В., Буаро М.Й., Тотолян Арег А.*
ВСТРЕЧАЕМОСТЬ МАРКЕРОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 245
- Пузырева Л.В., Конченко В.Д., Далабаева Л.М.*
СЕПСИС У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ 251
- Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В.*
ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕНОТИПА И МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА..... 259
- Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Пяташина М.А., Авдонина Л.Г., Юзлибаева Л.Р.*
ВНЕБОЛЬНИЧНЫЕ ПНЕВМОНИИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ЭТИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАЗОФАРИНГЕАЛЬНОГО НОСИТЕЛЬСТВА *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН 271
- Смирнов В.С., Петленко С.В., Савельев С.А., Редлих Г., Стукань Н.И.*
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ПРЕПАРАТА ВАРТОЦИД® (ИМИХИМОД 5% КРЕМ ДЛЯ ВНЕШНЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ) В ЛЕЧЕНИИ АНОГЕНИТАЛЬНЫХ БОРОДАВОК..... 279
- Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Жестков А.В., Ковалев А.М., Барышникова Л.А., Неняйкин С.С.*
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА..... 285

Краткие сообщения

- Фадеев А.В., Жилинская И.Н.*
СРАВНЕНИЕ ГЕНОМОВ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУСОСодержащего МАТЕРИАЛА 292
- Александина Н.В., Моисеева О.В.*
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВМЕСТНОГО ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛАКТОГЛОБУЛИНА И БАКТЕРИОФАГА САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО 297
- Башкетова Н.С., Чхинджерия И.Г., Бичурина М.А., Крайнова Т.И., Брянцева Е.А., Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Дегтярев О.В., Демакова Т.Е.*
ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОДЪЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2016 ГОДУ..... 303

Правила для авторов 309

Авторский указатель 312

Предметный указатель 312

CONTENTS

Reviews

- Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L.*
THE NEW LOOK AT NEUTROPHILIC GRANULOCYTES: RETHINKING OLD DOGMAS. PART 1219
- Vaganova A.N.*
MOLECULAR BACKGROUND OF FLUOROQUINOLONE RESISTANCE IN PATHOGENIC HUMAN MYCOPLASMAS.....231

Original articles

- Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Boiro M.Y., Totolian Areg A.*
THE OCCURRENCE OF THE MARKERS OF HEPATITIS C AMONG PRACTICALLY HEALTHY RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA: A PILOT STUDY 245
- Puzyryova L.V., Konchenko V.D., Dalabayeva L.M.*
SEPSIS AT HIV-POSITIVE PATIENTS.....251
- Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V., Cherdancev D.V., Pervova O.V.*
THE PHENOTYPE AND METABOLISM RELATIONSHIP OF BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS IN THE POSTOPERATIVE PERIOD DYNAMICS 259
- Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A., Tyurin Y.A., Isaeva G.S., Zaripova A.Z., Patyashina M.A., Avdonina L.G., Yuzlibaeva L.R.*
COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA PNEUMOCOCCAL ETIOLOGY AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF NASOPHARYNGEAL CARRIAGE IN CHILDREN IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN..... 271
- Smirnov V.S., Petlenko S.V., Savelyev S.A., G. Redlich, Stukan N.I.*
EFFICACY OF GENERIC DRUG WARTOCID® (IMIQUIMOD 5% CREAM FOR EXTERNAL USE) IN ANOGENITAL WARTS TREATMENT 279
- Lyamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kovalyov A.M., Baryshnikova L.A., Nenjakkin S.S.*
COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL 285

Short communications

- Fadeev A.V., Zhilinskaya I.N.*
COMPARISON OF INFLUENZA A(H1N1)pdm09 GENOMES OBTAINED FROM DIFFERENT TYPES OF VIRUS-CONTAINING MATERIAL 292
- Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V.*
EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE JOINT THERAPEUTIC ACTION OF LACTOGLOBULIN AND SALLMONELLA BACTERIOPHAGE 297
- Bashketova N.S., Chkyhindzheriya I.G., Bichurina M.A., Krainova T.I., Bryanceva E.A., Lavrentyeva I.N., Suhobaevskaya L.P., Degtjarev O.V., Demakova T.E.*
EPIDEMIC RISE IN THE INCIDENCE OF INFLUENZA IN ST. PETERSBURG IN 2016..... 303

Instructions to Authors 309

Author index 312

Subject index 312

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: ПЕРЕОСМЫСЛЕНИЕ СТАРЫХ ДОГМ. ЧАСТЬ 1

И.В. Нестерова^{1,2}, Н.В. Колесникова², Г.А. Чудилова², Л.В. Ломтатидзе²,
С.В. Ковалева², А.А. Евглевский², Т.З.Л. Нгуен¹

¹ ФГАБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия

Резюме. Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний. Нейтрофильные гранулоциты обладают мощным рецепторным репертуаром, обеспечивающим связь между собой и клетками иммунной системы, а также связь с клетками эндотелия, эпителия и других тканей. Индуцирующие стимулы активируют НГ и способствуют транслокации из цитоплазматических гранул и везикул молекул на поверхностную цитоплазматическую мембрану, секретируя широкий спектр про- и противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов, колониестимулирующих, ангиогенных и фиброгенных факторов, членов TNF суперсемейства, хемокинов, регуляторных белков и т.д. Хроматин ядер НГ способен к реструктуризации под влиянием индуцирующих стимулов, что сопряжено с экспрессией многочисленных генов цитокинов. Нейтрофильные гранулоциты, получающие комплексные цитокиновые влияния не только приобретают новые черты, но и проходят различные стадии активации и дифференцировки, участвуют как в процессах внутриклеточной интрафагосомальной дегрануляции, осуществляя киллинг и элиминацию фагоцитированных микроорганизмов, так и внеклеточной дегрануляции при формировании нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET), при этом погибая через NETosis. Особенности фенотипа НГ и их функциональных свойств демонстрируют наличие субпопуляций НГ с различными возможностями: разной рецепторной оснащенностью, способностью реструктуризировать хроматин, экспрессировать гены цитокинов и секретировать цитокины, реализовывать содержимое гранулярного аппарата, продуцировать активные формы кислорода, осуществлять цитотоксичность, образовывать NET. По нашему мнению, можно выделить следующие субпопуляции НГ: регуляторные; супрессорные; провоспалительные — инициирующие воспалительную реакцию; воспалительные с позитивным микробицидным потенциалом (антибактериальным, противовирусным, противогрибковым); воспалительные с негативным цитотоксическим потенциалом — «агрессивные»; противовоспалительные — регулирующие регрессию воспаления; противоопухолевые — TAN1; проопухолевые — TAN2; гибридные, сочетающие свойства НГ и дендритных клеток. Отсутствие адекватного реагирования, гиперактивация или блокада функций НГ приводит к развитию вялотекущих инфекционно-воспалительных заболеваний, не отвечающих на традиционную терапию, аутоиммунных/хронических заболеваний, иммунозависимых процессов. Ремоделирование дисфункций НГ — ключ к новой иммунотерапевтической стратегии.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, иммунофенотип, микробицидность, реструктуризация хроматина, экстрацеллюлярные сети, цитокинопродукция.

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123-1.
Тел.: 8 916 187-73-41 (моб.).
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Contacts:

Irina V. Nesterova
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky pr., 123-1.
Phone: +7 916 187-73-41 (mobile).
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Библиографическое описание:

Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 219–230. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230

Citation:

Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadize L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 219–230. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230

THE NEW LOOK AT NEUTROPHILIC GRANULOCYTES: RETHINKING OLD DOGMAS. PART 1Nesterova I.V.^{a,b}, Kolesnikova N.V.^b, Chudilova G.A.^b, Lomtadidze L.V.^b, Kovaleva S.V.^b, Evglevsky A.A.^b, Nguyen T.D.L.^a^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation^b Kuban State Medical University of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Numerous modern basic research done undeniable fact that neutrophilic granulocytes (NG) are key effector and regulatory circuits both innate and adaptive immunity, and play a crucial role in the pathogenesis of a wide range of diseases. NG have potent receptor repertoire, providing a connection between them, cells of the immune system, as well as communication with endothelial cells, epithelial and other tissues. NG inducing stimuli activate and promote the translocation of cytoplasmic granules and vesicles surface molecules on the cytoplasmic membrane the secretion of a large spectrum of pro- and anti-inflammatory, immunoregulatory cytokines, colony, angiogenic factors and fibrogenic, TNF superfamily members, chemokines, regulatory protein, etc. Chromatin nuclei NG capable of restructuring under the influence of inducing stimuli, which is associated with the expression of multiple cytokine genes. NG receiving complex cytokine influence not only acquire new features, but also in various stages of activation and differentiation processes involved in intracellular intraphagosomal degranulation and killing of implementing elimination microorganisms and extracellular neutrophil degranulation in the formation neutrophil extracellular traps (NET), while this dying through NETosis. Features NG phenotype and their functional properties, demonstrate the existence of subpopulations of NG with different capabilities: equipment of different receptor, the ability to restructure chromatin expressing cytokine genes and secrete cytokines to implement the contents of the granular system, produce reactive oxygen species, implement cytotoxicity form NET. In our opinion, there subpopulation NG: regulatory; suppressor; proinflammatory — initiating an inflammatory response; inflammation with a positive potential microbicidal (antibacterial, antiviral, antifungal); inflammatory cytotoxic potential of the negative — “aggressive”; anti-inflammation regulating regression; antitumoral — TAN1; pro-tumoral — TAN2; hybrid, combining the characteristics of NG and dendritic cells. The absence of adequate response, or hyperactivation blockade NG functions leads to the development of low-intensity infectious and inflammatory diseases, do not respond to conventional therapy of autoimmune diseases/chronic immune-dependent processes. Remodeling dysfunctions NG — the key to new immunotherapeutic strategies.

Key words: neutrophil granulocytes, immunophenotype, microbicide, extracellular traps, restructuring chromatin, cytokine production.

Впервые способность клеток иммунной системы — нейтрофильных гранулоцитов (НГ) — фагоцитировать и уничтожать микробных агентов описана в конце XIX в. нашим великим соотечественником И.И. Мечниковым. Традиционно НГ относили к «примитивным микрофагоцитам», «конечнодифференцированным клеткам», не способным к белковому синтезу. В настоящее время получены данные, демонстрирующие, что НГ не только уничтожают патогены, но и регулируют иммунный ответ и воспаление [1, 13]. В течение последних лет появились новые свидетельства о неожиданных функциях этих клеток. Доказано, что НГ участвуют в защите против внутриклеточных патогенов, таких как вирусы и микобактерии [32]. Нейтрофильные гранулоциты тесно связаны с адаптивным иммунным ответом, включая влияния на маргинальную зону В-клеток, на плазматоидные дендритные клетки, Т-клеточные субпопуляции и даже контролируют гомеостаз естественных киллерных клеток (NK). Показано, что НГ медируют альтернативный путь системной анафилаксии и являются участниками аллергических кожных реакций. И, наконец, было обнаружено, что НГ играют патогенетическую роль при диабете, атеросклерозе, формировании тромбов, что связано с уникальной способностью НГ обра-

зовывать нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (neutrophil extracellular traps — NET) даже в отсутствие патогена [46].

Уникальность работы НГ в условиях нормы и патологии состоит в необычайно быстрой реализации иммунных реакций, направленных в первую очередь на уничтожение патогена, но без внешнего проявления своего агрессивного потенциала. В свете современных представлений НГ являются уникальной мультипотентной популяцией клеток иммунной системы (ИС), относящейся к врожденному иммунитету, обладающей важными функциональными возможностями, позволяющими активировать и регулировать адаптивный иммунитет, способствуя его полноценной реализации. При этом от адекватной реализации физиологических функций НГ зависит постоянство иммунного гомеостаза в целом [1, 12]. В настоящее время НГ признаны антигенпрезентирующими клетками (АПК), способными к дифференцировке и активации ядра — реструктуризации хроматина, экспрессии многочисленных генов, синтезу и секреции цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и различных пептидов [12, 41, 59].

Свои весьма широкие функциональные возможности НГ реализуют благодаря мощному рецепторному аппарату, обеспечивающему взаи-

мосвязи как непосредственно в системе НГ, так и опосредующему связь НГ с клетками эндотелия, эпителия, клетками иммунной системы и различными тканями. Получены новые данные о способности НГ к обратной трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) из субэндотелиального пространства обратно в просвет сосудов, что сопровождается изменением фенотипа НГ, вследствие чего образуются субпопуляции НГ, которые могут принимать участие в распространении системного воспаления из очага поражения [14].

Рецепторный репертуар нейтрофильных гранулоцитов

Нейтрофильные гранулоциты — весьма лабильная клеточная популяция, оснащенная богатым репертуаром рецепторов, которые позволяют дифференцированно реагировать на малейшие изменения иммунного гомеостаза и функционируют как биологические сенсоры, опосредуя взаимосвязь НГ с экстрацеллюлярным окружением. На мембране НГ экспрессируется комплекс адгезионных молекул, рецепторов к различным лигандам: цитокинам, иммуноглобулинам, мембранным молекулам других клеток и т.д. Нейтрофильные гранулоциты экспрессируют различные антигенные детерминанты: МНС I; селектины и их рецепторы — CD62L, CD162 (PSGL-1); интегрины и их рецепторы — CD18 (β_2 -интегрин), CD11a (LFA-1), CD11b (CR3), CD11c (CR4), CD11d; рецепторы ICAM для β_2 -интегринов — ICAM-1 (CD50), ICAM-3 (CD54); рецепторы для хемоаттрактантов — рецепторы PFPR и FPLR для fMLP; рецепторы для хемокинов (CXCR1, CXCR2, CCR1); FcR — рецепторы CD16 (Fc γ RIII), CD32 (Fc γ RII), CD64 (Fc γ RI), CD89 (Fc α RI), Fc ϵ R; рецепторы для компонентов комплемента — CR1 (CD35), CR3 (CD11b), CR4 (CD11c), C5aR, C3aR, C5L2; CD14 — рецептор к ЛПС и эндотоксинам; CD15 — рецептор клеточной адгезии; CD17 — участие в связывании бактерий, в ангиогенезе и апоптозе; CD24 — участие в клеточной пролиферации и дифференцировке; паттерн-распознающие рецепторы (PRR) — TLR 1, 2, 4–10; NOD-рецепторы; CD28 — костимулирующий рецептор для В-лимфоцитов; CD95 — рецептор активации/индукции апоптоза; CD25 — рецептор к IL-2 (активационный маркер НГ); CD40, CD80, CD86, МНС II определяют способность НГ выступать в роли АПК. Нейтрофильные гранулоциты имеют многочисленные рецепторы к цитокинам (IL-8, TNF α , IL-1, IL-2, IL-15, IL-17, IFN α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF и др.), гормонам, нейропептидам, гистамину, киназам. Выявленная недавно экспрессия TCR-like

(TCRL, TCR $\alpha\beta$) на мембране НГ, представленная в течение всей жизни человека и снижающаяся в старости, открывает новые, ранее неизвестные иммунные механизмы функционирования НГ [25] (рис. 1).

Нейтрофильные гранулоциты оснащены рецепторами, распознающими эндогенные молекулы «опасности» — алармины или DAMPs (danger associated molecular patterns): внеклеточный АТФ, фрагменты внеклеточного матрикса, белки теплового шока, нуклеиновые кислоты (фрагменты ДНК и РНК собственных клеток), ядерный белок HMGB-1 и др., через которые происходит активация клетки и включение ее в реакцию воспаления [44]. Установлено, что рецепторным путем под влиянием TNF α , лиганда sTRAIL и IL-4 идет инициация апоптоза НГ у клинически здоровых лиц [17]. Недавно были описаны новые пути проведения сигнала активации НГ через ITAM/Syk — CARD9 при взаимодействии β -гликанов с дектином-1, в результате которого запускается синтез цитокина IL-23, индуцирующего образование Th17-клеток [5].

Сохранение пула рецепторов происходит внутриклеточно в гранулярном аппарате НГ, то есть на мембране секреторных везикул, желатиновых и специфических гранул, а под воздействием активаторов рецепторы транслоцируются на поверхностную мембрану [22]. Таким образом, мембранная экспрессия НГ не только отражает процессы, происходящие в течение жизненного цикла клетки, но и позволяет оценить по реорганизации поверхностной цитоплазматической мембраны НГ их функциональное праймирование.

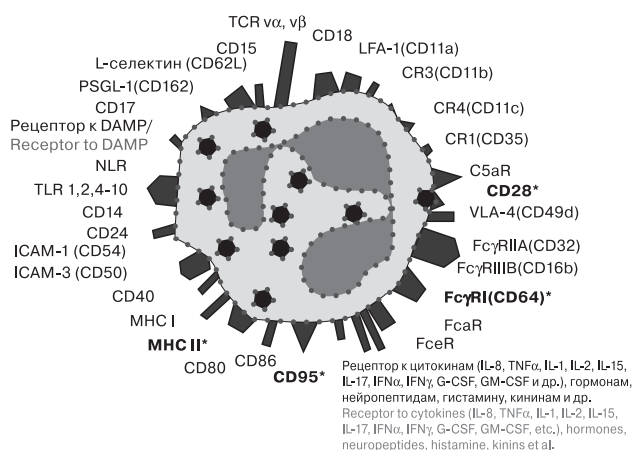


Рисунок 1. Поверхностные мембранные рецепторы нейтрофильных гранулоцитов

Figure 1. Surface membrane receptors of neutrophilic granulocytes

Примечание: *активированный НГ.

Note: *activated NG.

Гранулярный аппарат нейтрофильных гранулоцитов

Нейтрофильные гранулоциты обладают мощными кислородзависимыми и кислороднезависимыми механизмами, обеспечивающими выполнение микробицидной, цитотоксической и цитолитической функций, инициируя развитие базисной воспалительной реакции [12]. Цитолитический и цитотоксический потенциал НГ сконцентрирован в гранулярном аппарате и секреторных везикулах, которые являются не только простыми хранилищами протеолитических и бактерицидных протеинов до момента их активации и высвобождения либо во внеклеточное пространство при формировании NET, либо в фагоцитарные вакуоли, но и содержат важный резерв мембранных белков, встраивающихся в поверхностную мембрану НГ при экзоцитозе этих органелл [6]. Существуют три основных типа гранул НГ — первичные (азурофильные), вторичные (специфические), третичные (желатиновые) и секреторные везикулы. Азурофильные гранулы содержат широкий набор гидролаз и других ферментов: миелопероксидазу (МП), α -фукозидазу, 5'-нуклеотидазу, β -галактозидазу, арилсульфатазу, α -маннозидазу, N-ацетилглюкозаминидазу, β -глюкуронидазу, кислую глицерофосфатазу, лизоцим (мурамидазу), нейтральные протеазы (серпроцидины) — катепсин G, эластазу, коллагеназу, азурацидин, а также дефензины, кателицидины, лактоферрин, гранулофизин, кислые глюкозаминогликаны и другие вещества. Маркерами азурофильных гранул служат фермент МП и CD63. Специфические гранулы содержат ферменты лактоферрин, щелочную фосфатазу, лизоцим, NADPH-оксидазу, а также

белок VPI, связывающий витамин B12. Маркерами этих гранул служат лактоферрин и CD66. Желатиновые гранулы преимущественно содержат желатиназу, а секреторные везикулы — щелочную фосфатазу (рис. 2).

Нейтрофильные гранулоциты способны отвечать «респираторным взрывом» на различные антигенные воздействия. Нейтрофильные гранулоциты обладают феноменом внутриклеточной (внутрифагосомальной) и/или трансмембранной (экстрацеллюлярной, посредством экзоцитоза) дегрануляции. Рядом исследований доказано, что продукты гранул НГ, обладая цитолитическим действием, регулируют функционирование как самих НГ, так и других клеток по паракринным и аутокринным механизмам [48, 58]. Нейтрофильные гранулоциты обладают наибольшей из всех клеток организма способностью генерировать активные формы кислорода (АФК) и хлора, оказывающие цитопатическое действие, благодаря высокому содержанию в них NADPH-оксидазы и миелопероксидазы. Известно, что МП и NADPH-оксидаза обладают высокой способностью осуществлять внутрифагосомальный киллинг бактерий за счет наработки высоких концентраций АФК, супероксид-аниона, гидрогена пероксида, хлорноватистой кислоты [57]. NADPH-оксидаза имеется у небольшого количества «отдыхающих» циркулирующих НГ. При этом активация НГ может праймироваться цитокинами (GM-CSF, TNF α и IL-8), ЛПС и другими агентами. Праймирование — это «обоюдоострый меч», который при нормальном ответе НГ обеспечивает хороший внутрифагосомальный киллинг микроорганизмов, а при генерации большого количества АФК вызывает токсическое повреждение окружающих тканей и некоторых клеток ИС, например,

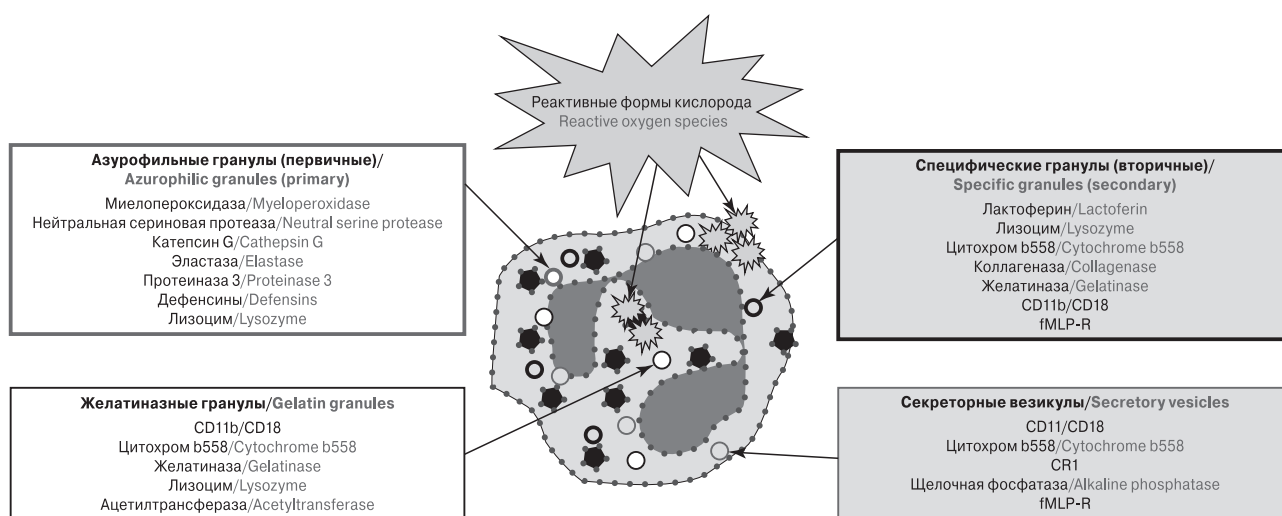


Рисунок 2. Гранулярный аппарат нейтрофильных гранулоцитов

Figure 2. Granular apparatus of neutrophilic granulocytes

Т-лимфоцитов [33, 49]. Вторичные нарушения активности NADPH-оксидазы ведут к нарушению микробицидной активности фагоцитов и развитию прогенных и микобактериальных инфекций [20]. Механизмы, управляющие феноменом активации NADPH-оксидазы и регулированием ее активности, до настоящего времени недостаточно изучены и потому не всегда понятны [6]. Детальное исследование алгоритма активации NADPH-оксидазы позволило бы разработать новые терапевтические стратегии для лечения воспалительных процессов, сопряженных с дефектом продукции АФК, ассоциированным с нарушением фагоцитарной функции, или ограничить повреждающее действие на ткани гиперпродуцированных АФК при иммунозависимых воспалительных процессах [27]. Нейтрофильные гранулоциты способны саморегулировать свой литический потенциал в реакциях антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), контролируя экзоцитоз азурофильных гранул через активность катепсина G, блокирование которого приводит к снижению высвобождения эластазы и МП [37, 48]. С микробицидными эффекторными механизмами НГ, опосредованными эластазой, катепсином G, нуклеосомами, связывают активацию внутрисосудистой коагуляции и усиление внутрисосудистого роста тромба *in vivo*, необходимых для существенного уменьшения уровня патогенов в тканях в процессе системного инфицирования [43].

Цитокинсекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов

Под влиянием разнообразных индуцирующих стимулов (микробные АГ, G-CSF, GM-CSF, IFN α , IFN γ , TNF α) НГ секретирует большой спектр провоспалительных (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-16, IL-18, MIF) и противовоспалительных (IL-1RA, IL-4, IL-10, TGF β 1, TGF β 2) цитокинов; иммунорегуляторных цитокинов (IFN α , IFN γ , IL-12, IL-23); колониестимулирующих факторов (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, CSF); ангиогенных и фиброгенных факторов (HB-EGF, HGF, FGF2, TGF α , VEGF, прокинетицин 2); членов суперсемейства TNF; CXC- и CC-хемокинов, других цитокинов (амфирегулин, BDNF, мидкин, NGF, NT4, онкостатин M, PBEF), различных регуляторных белков и т.д. [41, 52] (рис. 3).

Известное на данный момент значение НГ в патогенезе воспалительных, инфекционных, аутоиммунных и неопластических заболеваний идентифицирует НГ как важнейшую потенциальную цель для селективной фармакологической интервенции, действующей в двух направлениях: промотировать или ограничивать воспаление, тем самым влияя на патологические процессы *in vivo*. В этом контексте понимание механизмов модуляции НГ цитокинами или хемокинами и другими регуляторными пептидами позволяет глубже познать то, как НГ могут влиять на патофизиологические процессы [1, 12, 27, 54].

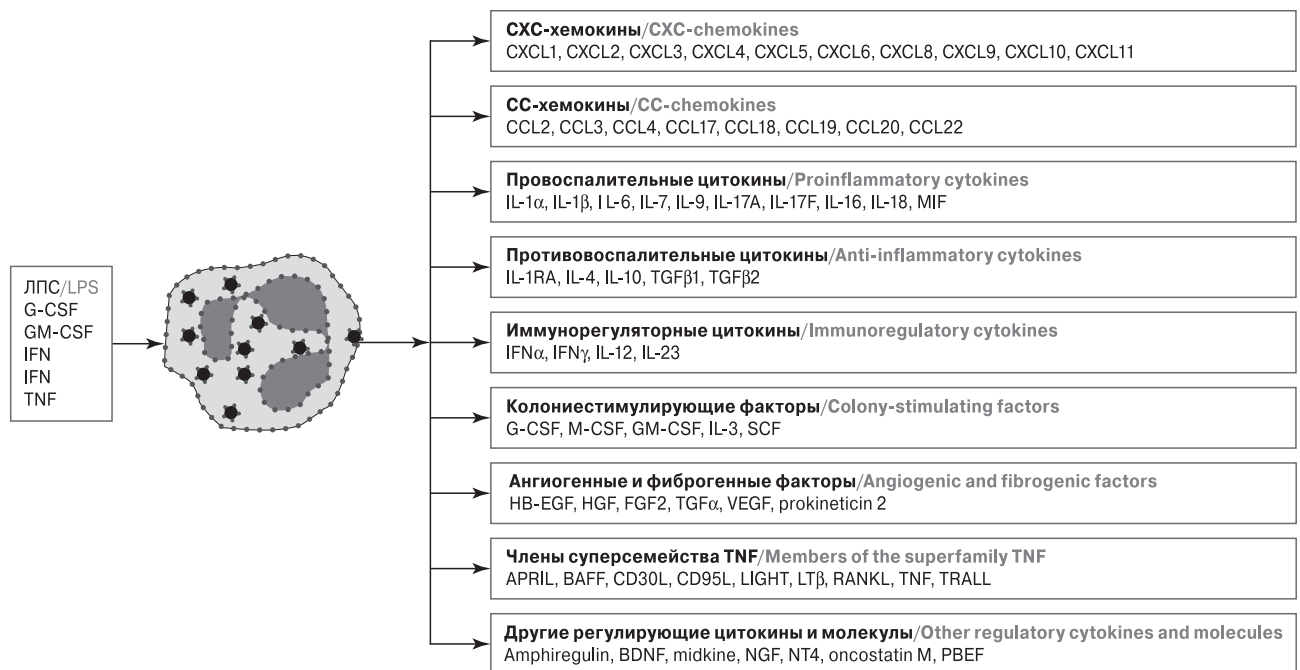


Рисунок 3. Цитокинпродуцирующая функция нейтрофильных гранулоцитов

Figure 3. Cytokine-producing function of neutrophilic granulocytes

Вопреки существующему устаревшему и широко распространенному неправильному мнению о том, что НГ — это короткоживущие дифференцированные клетки с конденсированным хроматином ядра и, следовательно, не способные к экспрессии генов и ответу на индукцию, сегодня рядом авторов показано, что НГ способны к транскрипционно-зависимому синтезу конститутивных и индуцированных белков теплового шока (HSP70), обладающих выраженными протективными свойствами [2], к экспрессии РНК-кодированных фагоцитарных рецепторов и к модулированию синтеза РНК в ответ на воздействие глюкокортикоидов или пектина [35]. Нейтрофильные гранулоциты могут также повышать экспрессию генов, вовлекаемых в реализацию фагоцитарной функции и отвечать на воздействие провоспалительных цитокинов (TNF α , G-CSF, IFN γ) дифференцировкой с приобретением рецепторов, присущих антигенпрезентирующим клеткам [34, 39, 55]. Длительность жизни НГ увеличивается в сайте воспаления, что индуцируется цитокинами микроокружения, включая GM-CSF, IL-8, Gro- α , при их контакте с ЛПС [16]. В противоположность этому, противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, ускоряют апоптоз в ЛПС-активированных НГ [31]. IL-17 регулирует гомеостаз НГ и влияет на воспаление, ослабляя его в тканях посредством торможения апоптоза НГ, индуцированного провоспалительными цитокинами [21].

Имеются множественные данные, демонстрирующие сопряженность активной реструктуризации хроматина ядер НГ с экспрессией многочисленных генов [29, 40, 51]. В ходе экспрессии генов структура хроматина претерпевает глубокие изменения. В состав хроматина — нуклеотида клеточного ядра, составляющего основу хромосом, входят ДНК, гистоны, негистоновые белки и РНК. Для активного хроматина характерны: модификация гистонов, повышенное содержание негистоновых белков, наличие деметилированной ДНК, угловое напряжение в ДНК, наличие свободных от нуклеосом зон (участков свободной ДНК) и т.д. В настоящее время стали хорошо известны 2 функции хроматина: первая состоит в том, что он в больших количествах входит в состав ДНК; вторая — он используется в качестве оружия для защиты целостности генома [15]. Следует отметить, что АТФ-зависимое ремоделирование хроматина является неотъемлемой частью поддержания константности генома [47]. Таким образом, хроматин рассматривается одновременно как защитник, так и регулятор генетической информации. Установлена взаимосвязь между изменением структуры хроматина и генной регуляцией

в ИС [51]. Показано, что изменения структуры хроматина являются регуляторным механизмом, управляющим транскрипцией генов цитокинов [40]. Существуют доказательства «модификации гистонов» и ремоделирования хроматина при бактериальной инфекции [29]. Zhang X. и соавт. изучили изменения генной экспрессии и структуры хроматина в НГ, активированных опсонизированной *E. coli* и хемотактантом (пептидом формил-мет-лей-фен) [59]. Результаты исследования выявили изменения уровня транскриптов 148 транскрипционных факторов и хроматин-ремодулирующих генов и 95 регуляторов белкового синтеза. Выявлено, что сочетанная транскрипционная регуляция, включающая изменения структуры хроматина, может играть определенную роль в быстрых изменениях генной экспрессии, которые возникают в НГ [59]. В то же время глобальные изменения в генной экспрессии НГ, возникающие во время рецептор-медицированного фагоцитоза, могут влиять на судьбу клеток, позитивно или негативно регулируя процессы апоптоза, а, следовательно, влиять на интенсивность и исход бактериального воспаления [38]. Основную роль в изменении топологического состояния ДНК играют ферменты топоизомеразы. Исследования топоизомераз выявили большое разнообразие этих ферментов в про- и эукариотических клетках. Была установлена биологическая функция ферментов разных типов, а также аналогии и различия в их структурах и механизмах действия, однако существующие в настоящее время методы их исследования являются весьма сложными и малоприменимыми в клинике. В то же время, метод поляризационной микроскопии, использующий оптический анизотропный эффект для изучения топологических свойств ядерного хроматина, позволяет эффективно тестировать структурные характеристики ядерного материала НГ на разных этапах функционирования клетки [4, 8, 9]. Величина анизотропии отражает структурно-молекулярную упорядоченность хроматина, который является основным носителем генетической информации в клетке. Снижение уровня анизотропии интерпретируется как показатель, свидетельствующий о явлениях деспирализации хроматина, сопровождающихся ослаблением химических связей комплекса ДНК–гистон в ядрах клеток. Подобные явления указывают на биологическую активацию хроматина, что является предпосылкой для появления матричной активности ДНК и, возможно, последующего белкового синтеза.

Нашими исследованиями показано, что хроматин ядер НГ способен к реструктуризации под влиянием различных индуцирующих сти-

мулов, что сопряжено с экспрессией многочисленных генов, в том числе и генов про- и противовоспалительных цитокинов [4, 8, 9]. В результате последних исследований уточнены связи между способностью хроматина НГ к ремоделированию, ассоциированному с уровнем экспрессии генов IL-8, IL-1 β и TNF α под влиянием глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) и IFN γ у здоровых лиц и больных инфекционно-воспалительными заболеваниями (ИВЗ). Показано, что уровень реструктуризации хроматина НГ тесно ассоциирован с относительной экспрессией провоспалительных цитокинов и может являться косвенным показателем уровня этой экспрессии. Так, у здоровых людей и больных с ИВЗ при индукции НГ в системе *in vitro* с помощью ГМДП и IFN γ происходит достоверное увеличение степени реструктуризации хроматина НГ, сопровождающееся увеличением экспрессии генов IL-8, IL-1 β и TNF α относительно неиндуцированного контроля. При этом у здоровых людей уровень относительной экспрессии генов цитокинов существенно выше, чем у больных ИВЗ. Этот феномен, по-видимому, связан с тем, что индукция экспрессии этих генов НГ в системе *in vitro* происходила на фоне уже ранее существовавшей их индукции *in vivo* при развитии патологического инфекционно-воспалительного процесса. Возможно, что нарушение экспрессии генов некоторых провоспалительных цитокинов у больных ИВЗ в период обострения, которая должна быть гораздо выше в случае адекватного ответа в остром периоде бактериальной инфекции, обуславливает хронизацию воспалительного бактериального процесса.

В ходе проведенных исследований нами выявлена мультивариантность ответа реструктуризации хроматина ядер НГ при различных патологических процессах: ревматоидном артрите, хроническом миелолейкозе, остром деструктивном панкреатите, колоректальном раке (КРР) и др. [4, 8, 9, 10, 45, 48]. Мы полагаем, что выяснение связи между структурой и функцией хроматина НГ, его способностью к реструктуризации при различных заболеваниях является весьма актуальной задачей. При этом следует подчеркнуть необходимость уточнения вариантов комплексных изменений активности ядерного хроматина в сопоставлении с особенностями ремоделирования рецепторного мембранного репертуара НГ, их функциональной активности и уровня выработки АФК [10].

Вышеизложенное позволяет утверждать, что НГ могут становиться участниками формирования «цитокиновой сети» посредством секреции и регуляции экспрессии генов целого ряда цитокинов, благодаря которым они не только принимают участие в ранней фазе острого вос-

паления и поддерживают прогрессию воспалительной реакции, но и инициируют последующую активацию специфического иммунного ответа.

Следует отметить, что хроматин участвует в уникальном механизме, присущем НГ: в формировании NET. При этом, к нитям ДНК (внеклеточно «выстрелившего хроматина») привязано экстрацеллюлярно выброшенное из цитоплазмы НГ их гранулярное содержимое — ферменты и белки [15].

Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети

Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети НГ — уникальный механизм, реализующий последний вариант противомикробной защиты [3, 7]. Осуществляя такого рода внеклеточный киллинг микроорганизмов, НГ погибают через NETosis [50]. При экстрацеллюлярной дегрануляции при образовании NET продукты гранул НГ (миелопероксидаза, протеазы, дефенсины и т.д.), «залипая» в сетях ядерной или митохондриальной ДНК, выстрелившей из НГ, осуществляют внеклеточный киллинг микроорганизмов. Формирование NET — финальный шаг программы активной клеточной смерти: NET образуются и реализуют свои действия в момент активной смерти НГ. NET формируются путем сложных морфологических перестроек в клетке, касающихся, прежде всего ядра [24]. Сетевые структуры появляются после дезинтеграции ядерной оболочки и гранулярных мембран. Морфология цитоплазмы и органелл остается неизменной и интактной, нет фрагментации ДНК и фосфатидилсерин не экспонируется перед клеточной смертью. Во время формирования NET не наблюдается активации каспаз, необходимых для запуска клеточной смерти через апоптоз. Клеточная смерть, возникающая в процессе формирования NET — важнейший механизм врожденного иммунного ответа, значительно отличающийся от апоптоза и некроза по морфологическим и молекулярным критериям. Она зависит от выработки АФК через активацию NADPH-оксидазы НГ [24]. На сегодняшний день известно, что хемокиновый рецептор, соединенный с G-белком (CXCR2), играющий важную роль при миграции НГ к очагу воспаления, опосредует образование NET, не зависящие от NADPH-оксидазы, но требующие участие Src-киназ, а блокада CXCR2-рецептора молекулами антагонистов приводит к подавлению образования NET, что коррелирует с благоприятным клиническим состоянием и свидетельствует об их патогенетической значимости [42].

Микробы, иммунные комплексы, аутоантигена, цитокины и другие стимулы (IL-8, TNF, IFN I и II типа) могут индуцировать NETosis через связывание с TLRs, FcR рецепторами или рецепторами комплемента [36]. Разнообразие белков NET зависит от стимула, который вызывает NETosis [26]. Факторы вирулентности бактерий могут оказывать нейтрализующие влияния на активность NET, например ДНКазы бактерий, вызывают деградацию ДНК NET [56]. Показано, что *Streptococcus pneumoniae* использует нуклеазы для того, чтобы атаковать ДНК компоненты NET и, таким образом, нейтрализует бактерицидную активность NET. Описаны врожденные дефекты формирования NET при хронической гранулематозной болезни: мутации в NADPH-оксидазе нарушают формирование NET [30]. Недавние исследования показали, что у новорожденных имеет место дефектное формирование NET, что может быть причиной развития тяжелой гнойно-септической патологии [23]. Кроме того, было выявлено феномен формирования NET при некоторых патологических состояниях: преэклампсии [28], стрептококковых инфекциях, пневмококковой пневмонии и при сепсисе [56]. Широкое разнообразие патогенов (бактерии, грибы, простейшие, паразиты и даже вирусы, в том числе ВИЧ-1) может вызвать образование NET и быть убитыми НГ [15]. В дополнение к позитивной роли NET (внеклеточный киллинг микроорганизмов: вирусов, бактерий, грибов) показаны их негативные эффекты при некоторых иммунозависимых заболеваниях. Так, NET принимает активное участие в развитии аутоиммунного воспаления при системной красной волчанке, васкулитах и т.д. Активация оси тромбоциты–НГ приводит к возникновению NET и формированию тромбов, в том числе при сепсисе. Установлено участие NET в повреждении тканей [18]. Известно, что NET могут разрушить кишечные эпителиальные клетки, эндотелий, особенно при системной красной волчанке (СКВ) и сепсисе [53]. NET-индуцированное повреждение отмечено при астме, респираторном дистресс-синдроме у взрослых, кистозном фиброзе легких [18]. Другой побочный эффект NET — это гиперактивация системы коагуляции, наблюдаемая при атеросклерозе и сепсисе (синдром внутрисосудистого свертывания) [24]. Таким образом, поддержание правильного баланса между формированием NET и сокращением их количества имеет важное значение. В связи с этим, в качестве нового терапевтического подхода для лечения NET-опосредованных заболеваний рассматривается использование ДНКазы, антипротеаз, ингибитора миелопероксидазы и антигистоновых антител.

Гибель нейтрофильных гранулоцитов: некроз, апоптоз и NETosis

Нейтрофильные гранулоциты имеют три пути для реализации своего драматического ухода — клеточной смерти, отличающиеся как тонкими молекулярными механизмами, так и степенью повреждающего воздействия на макроорганизм: некроз, апоптоз и NETosis. В результате некроза, происходит лизис цитоплазматической мембраны и выход содержимого НГ в окружающие ткани, что приводит к чрезмерной продукции цитокинов, и, нередко, к гиперактивации ИС с развитием локальной и системной воспалительной реакции и повреждением органов и тканей (гнойно-септические заболевания, аутоиммунные и аллергические болезни).

Конститутивная запрограммированная гибель НГ — апоптоз — критичный процесс, модулирующий их количество и функции. Апоптоз играет важную роль в нейтрофильном гомеостазе и разрешении воспаления, и, как считается, является самым благоприятным вариантом клеточной смерти, поскольку повреждающее действие на окружающие ткани отсутствует. В то же время, гибель НГ может провоцироваться воспалительным экстрацеллюлярным микроокружением (провоспалительные цитокины, клеточная адгезия, фагоцитоз, эритроциты, тромбоциты) и приводить к нейтропении, которая осложняет течение сепсиса и других инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ) [11]. Показано, что апоптоз НГ может лимитировать повреждающее действие воспаления при сепсисе и респираторном дистресс-синдроме (РДС). В то же время у пациентов с сепсисом апоптоз НГ обратно пропорционален тяжести сепсиса и может служить маркером тяжести септического процесса [41]. Нейтрофильные гранулоциты способны регулировать уровень тканевых НГ в зоне воспаления, продуцируя лизофосфатидилсерин, генерированный NADPH-оксидазой, который, являясь противовоспалительным медиатором, работает *in vivo* и обеспечивает ранний и быстрый клиренс рекрутированных в ткани НГ за счет перепрограммирования макрофагов на эффероцитоз тканевых НГ [29]. Стресс, в частности хирургический операционный стресс, негативно влияет на FAS-индуцированный апоптоз НГ периферической крови, что ассоциировано со значительным снижением уровней сывороточных GM-CSF, IL-6, IL-8 в первый день после операции. При этом у пациентов с острым воспалением повышается sFas в плазме, что ведет к ингибированию Fas-медирированного апоптоза НГ. Более того, активация PI 3-K и ERK-зависимого сигнального пути также ве-

дет к снижению Fas-медиированного апоптотического ответа в НГ [31]. NETosis отличается от других классических процессов клеточной гибели — апоптоза и некроза — прежде всего, деконденсацией хроматина и дезинтеграцией ядерной оболочки, исчезновением цитоплазматических гранул и смешиванием ядерного содержимого с материалом цитоплазмы. Молекула ДНК высвобождается из клетки без фрагментации ее эндонуклеазами. При апоптозе, наоборот, хроматин конденсируется и происходит его фрагментация без нарушения целостности ядерной оболочки. При некрозе нарушается целостность самой клетки, она лизируется, но без развития изменений в гранулах и ядерной мембране. Сетеподобная структура, состоящая из молекулы ДНК и содержимого цитоплазматических гранул, при некрозе и апоптозе не разрушается [6, 24].

Таким образом, в настоящее время убедительно показано, что НГ являются зеркалом гомеостаза. В борьбе с патогенами НГ проявля-

ют не только внутриклеточную фагоцитарную активность, но и уничтожают их при помощи формирования NET, выброса экстрацеллюлярных везикул. Нейтрофильные гранулоциты способны к синтезу белков *de novo*, то есть обладают белок-синтетической функцией, секретуют большое количество гранулярных ферментных и неферментных белков, обладающих антибактериальными и регуляторными свойствами, цитокинов, хемокинов, регуляторных молекул, ростовых факторов и др. На поверхности мембраны НГ экспрессированы сотни различных молекул-рецепторов, обеспечивающих их связь с микроокружением и другими клетками иммунной системы.

Обсуждение новых свойств НГ, особенностей трансформации их фенотипа, характеристика субпопуляций НГ и их свойств при вирусных и бактериальных инфекциях, нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях будет продолжено во второй части настоящего обзора.

Список литературы/References

1. Бережная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев: Наукова думка, 1988. 205 с. [Berezhnaja N.M. Neitrofilny i immunologicheskii gomeostaz [Neutrophils and immunological homeostasis]. *Kiev: Naukova dumka, 1988, 205 p.*]
2. Бойко А.А., Ветчинин С.С., Сапожников А.М., Коваленко Е.И. Изменение уровня белков теплового шока семейства 70 кДа в нейтрофилах человека под действием теплового шока // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40, № 5. С. 528–540. [Boyko A.A., Vetchinin S.S., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. Changes in the heat shock 70 kDa protein level in human neutrophils induced by heat shock. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry, 2014, vol. 40, no. 5, pp. 528–540. doi: 10.7868/S0132342314050042 (In Russ.)*]
3. Долгушин И.И., Шишков Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. Москва: РАМН, 2009. 208 с. [Dolgushin I.I., Shishkov Ju.S., Savochkina A.Ju. Neitrofil'nye lovushki i metody otsenki funktsional'nogo statusa neitrofilov [Neutrophil traps and methods for assessing the functional status of neutrophils]. *Moscow: RAMN, 2009, 208 p.*]
4. Евглевский А.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В. Особенности реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов при хроническом миелолейкозе // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6, № 4. С. 384–381. [Evglevskij A.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V. Features chromatin restructuring of neutrophilic granulocytes in chronic myeloid leukemia. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2012, vol. 6, no. 4, pp. 384–381. (In Russ.)*]
5. Киселева Е.П. Новые представления о противои инфекционном иммунитете // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 1. С. 9–14. [Kiseleva E.P. New ideas about anti-infective immunity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 9–14. doi: 10.15789/2220-7619-2011-1-9-14 (In Russ.)*]
6. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически-активных рецепторов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 1. С. 79–87. [Kravcov A.L., Shmel'kova T.P. Secretory degranulation of neutrophils as a trigger inflammation and control the immune response: the role of serine proteases and proteolytic leukocyte-receptor activity. *Epidemiologiya i vaktzinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2011, no. 1, pp. 79–87. (In Russ.)*]
7. Нестерова И.В. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети: протекция и защита // International Journal on Immunorehabilitation. 2009. Т. 1, № 1. С. 25–26. [Nesterova I.V. Neutrophil extracellular network: patronage and protection. *International Journal on Immunorehabilitation, 2009, vol. 11, no. 1, pp. 25–26. (In Russ.)*]
8. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Колесникова Н.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислород-зависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке // Российский иммунологический журнал. 2011. Т. 5(14), № 3–4. С. 254–261. [Nesterova I.V., Evglevskij A.A., Fomicheva E.V., Kolesnikova N.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kokov E.A., Kokova L.N. Features of spontaneous and induced chromatin restructuring and functioning of the oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of neutrophil granulocytes in colorectal cancer. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2011, vol. 5(14), no. 3–4, pp. 254–261. (In Russ.)*]
9. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Калашников А.Е. Особенности реструктуризации хроматина и изменение уровня относительной экспрессии генов IL-8, IL-1 β и TNF α нейтрофильных гранулоцитов под влиянием глюкозаминилмурамилдипептида и интерферона- γ у больных хроническим

- гайморитом в системе *in vitro* // Иммунология. 2015. Т. 36, № 6. С. 363–367. [Nesterova I.V., Evglevskij A.A., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Kalashnikov A.E. Features of chromatin restructuring and changes in the level of relative expression of IL-8, IL-1 β and TNF α genes of neutrophilic granulocytes under the influence of glucosaminylmuramyl dipeptide and interferon- γ in patients with chronic sinusitis in an *in vitro* system. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 36, no. 6, pp. 363–367. (In Russ.)]
10. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология. 2012. Т. 33, № 5. С. 281–288. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Evglevskij A.A. The dual role of neutrophils in the implementation of the antitumor protection. *Immunologiya = Immunology*, 2012, vol. 33, no. 5, pp. 281–288. (In Russ.)]
 11. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И., Тараканов В.А., Смерчинская Т.В., Сапун О.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В., Кокова Л.Н., Стрюковский А.Е. Различные варианты дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6, № 2. С. 170–176. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Kleshchenko E.I., Tarakanov V.A., Smerchinskaja T.V., Sapun O.I., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Fomicheva E.V., Kokova L.N., Stryukovskij A.E. Different variants of functioning defects of neutrophil granulocytes in patients with congenital pneumonia in newborns. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, vol. 6, no. 2, pp. 170–176. (In Russ.)]
 12. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А., Фомичева Е.В., Быковская Е.Ю. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы // Аллергология и иммунология. 2008. Т. 9, № 4. С. 432–435. [Nesterova I.V., Shvydchenko I.N., Romenskaya V.A., Fomicheva E.V., Bykovskaya E.Yu. Granulocytes — key cells of the immune system. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2008, vol. 9, no. 4, pp. 432–435. (In Russ.)]
 13. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. 3-е изд. М.: Медицина. 2010. 752 с. [Haitov R.M., Ignat'eva G.A., Sidorovich I.G. *Immunologiya. Norma i patologiya* [Immunology. Health and disease]. 3rd ed. Moscow: Meditsina, 2010, 752 p.]
 14. Beyrau M., Bodkin J.V., Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol.*, 2012, vol. 2, no. 11, pp. 120–134. doi: 10.1098/rsob.120134
 15. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.*, 2012, vol. 198, pp. 773–783. doi: 10.1083/jcb.201203170
 16. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C.W., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., Nash G.B., Rainger G.E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 79, pp. 303–311. doi: 10.1189/jlb.0905496
 17. Cassatella M.A. On the production of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 79, pp. 1140–1149. doi: 10.1189/jlb.1005558
 18. Cheng O.Z., Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 24, pp. 4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00001
 19. Courtney Frasch S., Fernandez-Boyanapalli R.F., Zemski Berry K.A., Murphy R.C., Leslie C.C., Nick J.A., Henson P.M., Bratton D.L. Neutrophils regulate tissue neutrophilia in inflammation via the oxidant-modified lipid lysophosphatidylserine. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 7, pp. 4583–4593. doi: 10.1074/jbc.M112.438507
 20. De Oliveira-Junior E.B., Bustamante J., Newburger P.E., Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2011, vol. 73, no. 5, pp. 420–427. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02501.x
 21. Dragon S., Saffar A.S., Shan L., Gounni A.S. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol. Immunol.*, 2008, vol. 45, no. 1, pp. 160–168. doi: 10.1016/j.molimm.2007.04.027
 22. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002, vol. 28, no. 2, pp. 260–274.
 23. Fadeel B. Babies born without safety NET. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 25, pp. 6270–6271. doi: 10.1182/blood-2009-03-210328
 24. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., Schatzberg D., Monestier M., Myers D.D. Jr, Wroblewski S.K., Wakefield T.W., Hartwig J.H., Wagner D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 36, pp. 15880–15885. doi: 10.1073/pnas.1005743107
 25. Fuchs T., Püellmann K., Scharfenstein O., Eichner R., Stobe E., Becker A., Pechlivanidou I., Kzhyshkowska J., Gratchev A., Ganser A., Neumaier M., Beham A.W., Kaminski W.E. The neutrophil recombinatorial TCR-like immune receptor is expressed across the entire human life span but repertoire diversity declines in old age. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, vol. 419, no. 2, pp. 309–315. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.017
 26. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z., Punaro M., Baisch J., Guiducci C., Coffman R.L., Barrat F.J., Banachereau J., Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3, pp. 73ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001201
 27. Gougerot-Pocidalo M.A., El Benna J., Elbm C., Chollet-Martin S., Dang M.C. Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *J. Soc. Biol.*, 2002, vol. 196, no. 1, pp. 37–46.
 28. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Human Immunol.*, 2005, vol. 66, no. 11, pp. 1146–1154. doi: 10.1016/j.humimm.2005.11.003
 29. Hamon V.F., Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe.*, 2008, vol. 4, no. 2, pp. 100–109. doi: 10.1016/j.chom.2008.07.009
 30. Heyworth P.G., Cross A.R., Curnutte J.T. Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003, vol. 15, pp. 578–584.
 31. Hofman P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2004, vol. 3, no. 1, pp. 1–9.

32. Hung S.L., Chiang H.H., Wu C.Y., Hsu M.J., Chen Y.T. Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils. *J. Periodontal Res.*, 2012, vol. 47, no. 5, pp. 635–644. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01476.x
33. Hurtado-Nedelec M., Makni-Maalej K., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M., El-Benna J. Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst. *Methods Mol. Biol.*, 2014, vol. 1124, pp. 405–412. doi:10.1007/978-1-62703-845-4_23
34. Iking-Konert C., Wagner C., Deneffle B., Hug F., Schneider M., Andrassy K., Hansch G.M. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, vol. 130, no. 3, pp. 501–508. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.02008.x
35. Jack R.M., Fearon D.T. Selective synthesis of mRNA and proteins by human peripheral blood neutrophils. *J. Immunol.*, 1988, vol. 140, no. 12, pp. 4286–4293.
36. Kaplan M. J., Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.*, 2012, vol. 189, no. 6, pp. 2689–2695. doi: 10.4049/jimmunol.1201719
37. Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H., Winterbourn C.C., Nauseef W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, vol. 93, no. 2, pp. 185–198. doi: 10.1189/jlb.0712349
38. Kobayashi S.D., De Leo F.R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2009, vol. 1, no. 3, pp. 309–333. doi:10.1002/wsbm.32
39. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Buhl C.L., Stahl R.M., DeLeo F.R. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, pp. 6901–6906. doi: 10.1073/pnas.092148299
40. Li B., Carey M., Workman J.L. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 2007, vol. 128, no. 4, pp. 707–719. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015
41. Mantovani A., Cassatella M.C., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 519–531. doi: 10.1038/nri3024
42. Marcos V., Zou Z., Yildirim A.O., Bohla A., Hector A., Vitkov L., Wiedenbauer E.M., Krautgartner W.D., Stoiber W., Belohradsky B.H., Rieber N., Kormann M., Koller B., Roscher A., Roos D., Griese M., Eickelberg O., Döring G., Mall M.A., Hartl D. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat. Med.*, 2010, vol. 16, no. 9, pp. 1018–1023. doi: 10.1038/nm.2209
43. Massberg S., Grahl L., Von Bruehl M.L., Manukyan D., Pfeiler S., Goosmann C., Brinkmann V., Lorenz M., Bidzhekov K., Khandagale A.B., Konrad I., Kennerknecht E., Reges K., Holdenrieder S., Braun S., Reinhardt C., Spannagl M., Preissner K.T., Engelmann B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.*, 2010, vol. 16, no. 8, pp. 887–896. doi: 10.1038/nm.2184
44. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue control? *Nature Immunol.* 2007, vol. 8, pp. 11–13. doi: 10.1038/ni0107-11
45. Metelitsa L.S., Gillies S.D., Super M., Shimada H., Reynolds C.P., Seeger R.C. Antidiallogangliosid/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on Fc γ RII(CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 11, pp. 4166–4173.
46. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.*, 2013, vol. 210, no. 7, pp. 1283–1290. doi: 10.1084/jem.2012220
47. Morrison A. J., Shen X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, no. 10, pp. 373–384. doi: 10.1038/nrm2693
48. Ottonello L., Epstein A.L., Mancini M., Dapino P., Dallegri F. Monoclonal LYM-1 antibody-dependent cytotoxicity by human neutrophils exposed to GM-CSF: auto-regulation of target cell attack by cathepsin G. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, vol. 75, no. 1, pp. 99–105. doi: 10.1189/jlb.0403133
49. Pillay J., Kamp V.M., Van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L.A. Subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.*, 2012, vol. 122, no. 1, pp. 327–336. doi: 10.1172/JCI57990
50. Remijnsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E., Lippens S., Vandenabeele P., Vanden Berghe T. NETosis, mechanisms behind an anti-microbial cell death modality. *Cell Death Differ.*, 2011, vol. 18, pp. 581–588. doi: 10.1038/cdd.2011.1
51. Smale S.T., Fisher A.G. Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 20, pp. 427–462. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064739
52. Smuda C., Wechsler J.B., Bruce P.J. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a PI3 kinase dependent mechanism. *J. Immunol. Lett.*, 2011, vol. 141, no. 1, pp. 102–108. doi: 10.1016/j.imlet.2011.08.002
53. Tamassia N., Cassatella M.A. Cytoplasmic receptors recognizing nucleic acids and mediating immune functions in neutrophils. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2013, vol. 13, no. 4, pp. 547–554. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.003
54. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.*, 2014, vol. 1124, pp. 451–467. doi: 10.1007/978-1-62703-845-4_27
55. Vercauteren D., Piest M., Van der Aa L.J., Al Soraj M., Jones A.T., Engbersen J.F., De Smedt S.C., Braeckmans K. Flotillin-dependent endocytosis and a phagocytosis-like mechanism for cellular internalization of disulfide-based poly(amido amine)/DNA polyplexes. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 11, pp. 3072–3084. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.045
56. Wartha F., Beiter K., Albiger B., Fernebro J., Zychlinsky A., Normark S., Henriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.*, 2007, vol. 9, no. 5, pp. 1162–1171. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x
57. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, vol. 18, no. 6, pp. 642–660. doi: 10.1089/ars.2012.4827
58. Yang C.W., Strong B.S., Miller M.J., Unanue E.R. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J. Immunol.*, 2010, vol. 185, no. 5, pp. 2927–2934. doi: 10.4049/jimmunol.1001289

59. Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y., Poddar R., Whitney C., De Tora A., Weissman S.M., Newburger P.E. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, vol. 75, no. 2, pp. 358–372. doi: 10.1189/jlb.0903412

Авторы:

Нестерова И.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии Факультета повышения квалификации медицинских работников Медицинского института ФГБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России (ФПК МИ ФГБОУ ВО РУДН), Москва, Россия; главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России (ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ), г. Краснодар, Россия;

Колесникова Н.В., д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Чудилова Г.А., к.б.н., доцент, зав. отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Ломтатидзе Л.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Ковалева С.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Евглевский А.А., к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Нгуен Т.З.Л., аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МИ ФГБОУ ВО РУДН, Москва, Россия.

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Allergology and Immunology FAT MW of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation; Chief Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory (CSRL), Kuban State Medical University (KSMU) of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Kolesnikova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Chudilova G.A., PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Lomtadize L.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Evglevsky A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Nguyen T.D.L., Postgraduate Student of the Department of Allergology and Immunology FAT MW of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА МИКОПЛАЗМ К ФТОРХИНОЛОНАМ

А.Н. Ваганова

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

Резюме. Патогенные для человека микоплазмы из-за отсутствия клеточной стенки устойчивы к ряду антибиотиков. Для лечения микоплазмозов чаще всего используют макролиды, однако распространение устойчивых к ним форм требует применения альтернативных схем лечения, в частности, назначения фторхинолонов и тетрациклинов. Из существующих противомикробных соединений только фторхинолоны обладают бактерицидным эффектом в отношении микоплазм, поэтому их применение предпочтительно при лечении пациентов в состоянии иммуносупрессии. Ограничением применения фторхинолонов может стать устойчивость возбудителя к соединениям данной группы. Наиболее частой причиной развития устойчивости к фторхинолонам как у микоплазм, так и у других бактерий являются мутации, ведущие к аминокислотным заменам в составе мишеней фторхинолонов: гиразы и топоизомеразы IV. Отмечено, что для микоплазм, относящихся к различным видам, характерны разные паттерны замен в субъединицах гиразы и топоизомеразы IV. Причиной могут быть различия в структуре этих белков, отражающиеся в видовых особенностях природной восприимчивости к фторхинолонам у микоплазм. Ряд исследований указывает на существование дополнительных механизмов резистентности, к которым, в первую очередь, относятся системы множественной резистентности. Подобные системы, относящиеся к группе ABC-транспортеров, были найдены и у микоплазм. Они описаны у *Mycoplasma hominis* и *M. pneumoniae*, причем у *M. hominis* наблюдалась их способность к выведению из клеток фторхинолонов, а у *M. pneumoniae* отмечена способность систем множественной резистентности экспортировать макролиды. Гены, кодирующие компоненты систем множественной резистентности, были найдены и в геномах других видов, в том числе *M. genitalium* и микоплазм, вызывающих заболевания животных. Также у непатогенных для человека микоплазм вида *Acholeplasma laidlawii* была обнаружена ассоциированная с устойчивостью к фторхинолонам способность к экспорту белков и генетического материала. Понимание роли мутаций, активности транспортеров и их кумулятивного эффекта в развитии устойчивости к фторхинолонам особенно важно в контексте определения устойчивости к фторхинолонам у плохо поддающихся культивированию патогенов *M. genitalium* и *M. pneumoniae*. Молекулярно-биологические методы определения устойчивости к противомикробным соединениям в настоящее время входят в клиническую практику, однако недостаток сведений о молекулярных основах устойчивости микоплазм делает результат недостаточно информативным для патогенов данной группы. В обзоре рассмотрены особенности развития устойчивости к фторхинолонам у патогенных для человека микоплазм разных видов и их проявления на молекулярном уровне.

Ключевые слова: микоплазмы, инфекции, фторхинолоны, устойчивость, мутации, MDR-транспортеры.

Адрес для переписки:

Ваганова Анастасия Николаевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-01-08 (служебн.).
E-mail: van.inprogress@gmail.com

Contacts:

Anastasiya N. Vaganova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-01-08 (office).
E-mail: van.inprogress@gmail.com

Библиографическое описание:

Ваганова А.Н. Молекулярные основы устойчивости патогенных для человека микоплазм к фторхинолонам // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 231–244. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-231-244

Citation:

Vaganova A.N. Molecular background of fluoroquinolone resistance in pathogenic human mycoplasmas // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 231–244. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-231-244

MOLECULAR BACKGROUND OF FLUOROQUINOLONE RESISTANCE IN PATHOGENIC HUMAN MYCOPLASMAS

Vaganova A.N.

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

Abstract. Human mycoplasma pathogens are resistant to many types of antibiotics because of the lack of a cell wall. Macrolides are most often used for the treatment of mycoplasmosis, but the spread of forms resistant to these antibiotics requires the use of alternative treatment regimens, in particular, the administration of fluoroquinolones and tetracyclines. Of the existing antimicrobial compounds, only fluoroquinolones have a bactericidal effect against mycoplasmas, so use of these antimicrobials is preferable for the treatment of immunosuppressed patients. The limitation of the fluoroquinolones is the resistance of the causative agent to these antimicrobials. Mutations leading to amino acid substitutions in the composition of the targets of fluoroquinolones, gyrase and topoisomerase IV are the most common cause of resistance to fluoroquinolones both in mycoplasmas and in other bacteria. It was noted that for mycoplasmas belonging to different species have different patterns of substitutions in the subunits of gyrase and topoisomerase IV. The differences of the structure of these proteins, reflected in the natural susceptibility to fluoroquinolones in mycoplasmas, may be a reason of this heterogeneity. A number of studies indicate the existence of additional resistance mechanisms, which, first of all, include multiple-resistance systems. Such systems belonging to the ABC-transporter group were also found in mycoplasmas. They are described in *Mycoplasma hominis* and *M. pneumoniae*, in *M. hominis*, their ability to excrete fluoroquinolones from the cells was observed, and in *M. pneumoniae* the ability of multiple-resistance systems to export macrolides also was noted. Genes encoding components of multiple resistance systems have been found in genomes of other species, including *M. genitalium* and mycoplasmas, causing animal diseases. Also, in the non-pathogenic for human mycoplasmas *Acholeplasma laidlawii*, the ability to export proteins and genetic material associated with resistance to fluoroquinolones was found. Understanding the role of the mutations, the activity of transports and their cumulative effect in the development of resistance to fluoroquinolones is particularly important in the context of the determination of resistance to fluoroquinolones in difficult to culture pathogens *M. genitalium* and *M. pneumoniae*. Molecular methods for determining the resistance to antimicrobials are now included in clinical practice, but the lack of information about the molecular bases of mycoplasma resistance makes the result insufficiently informative for the pathogens of this group. In the review, the features of the development of resistance to fluoroquinolones in various species of human pathogenic mycoplasmas and their mechanisms at molecular level will be described.

Key words: mycoplasmas, infections, fluoroquinolone, resistance, mutations, MDR-transporters.

Введение

Микоплазмы — лишённые клеточной стенки бактерии, относящиеся к типу *Tenericutes* [42]. Большинство видов микоплазм является комменсалами, однако некоторые могут вызывать заболевания человека, животных и растений. Повреждение тканей при микоплазмозах во многом связано с выделением продуктов метаболизма патогена, приводящих к развитию воспаления. При малом размере генома у микоплазм имеются разнообразные факторы патогенности — адгезины, белки, вызывающие перестройки цитоскелета клеток эукариот и другие. Микоплазменные инфекции обычно не представляют угрозы для жизни пациента, но иногда могут протекать и в тяжелых формах [23]. В настоящее время патогенными для человека признаны *Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *Ureaplasma* spp., а также менее распространенные *M. spermatophilum*, *M. penetrans*, *M. salivarium*, *M. orale* и *M. primateum* [42].

Отсутствие клеточной стенки определяет устойчивость микоплазм к бета-лактамам, гликопептидам и фосфомицину; поэтому для

лечения инфекций, вызванных патогенами данной группы, применяют макролиды, тетрациклины и фторхинолоны. Обычно препаратами первого выбора при заболеваниях, вызванных микоплазмами, служат малотоксичные макролиды, в первую очередь азитромицин и джозамицин. Фторхинолоны являются наиболее востребованными для лечения диссеминированных микоплазмозов у пациентов в состоянии иммуносупрессии, поскольку эти соединения, в отличие от макролидов и тетрациклинов, обладают бактерицидным, а не только бактериостатическим действием против патогенных микоплазм [7].

Доля устойчивых к различным противомикробным соединениям микоплазм высока. До 50% изолятов *M. genitalium* невосприимчивы к тетрациклину [10], устойчивы к макролидам — 17,2–43,4% [18, 46, 76], а около 15% — к фторхинолонам [14]. Доля устойчивых к макролидам штаммов *M. pneumoniae* может достигать 80% [37, 85]. Распространены устойчивые варианты и среди других видов микоплазм, патогенных для человека [38, 41, 87]. Частота встречаемости устойчивых форм мо-

жет различаться в разных странах, что связано с принятыми правилами применения антибиотиков [57, 87].

При инфекциях, вызванных устойчивой к макролидам *M. genitalium*, используют моксифлоксацин — препарат фторхинолонового ряда [14, 80], в то время как гатифлоксацин, цiproфлоксацин, офлоксацин и левофлоксацин неэффективны при лечении подобных инфекций [53, 57]. В случае *M. pneumoniae* фторхинолоны также эффективны против инфекций, устойчивых к макролидам азитромицину и джозамицину [14, 28]. Устойчивые к доксициклину изоляты уреоплазмы часто резистентны к макролидам, норфлоксацину и цiproфлоксацину, но не к офлоксацину [87]. Благодаря тому, что случаи перекрестной устойчивости микоплазм к макролидам и фторхинолонам редки, применение фторхинолонов рекомендуется для лечения заболеваний, вызванных невосприимчивыми к макролидам микоплазмами.

Фторхинолоны являются синтетическими противомикробными соединениями. Общим структурным элементом молекул данной группы является бициклическое ароматическое ядро, образованное пиридоновым и ароматическим кольцами. У всех фторхинолонов углерод в положении 6 ароматического кольца связан с атомом фтора. В положении 3 к пиридоновому кольцу присоединен карбоксильный остаток, в положении 4 — кетогруппа, и именно они определяют антимикробную активность соединений данного ряда. В положении 7 присоединяются различные заместители в виде пяти-шестичленных диамидов, к углероду в положении 8 и азоту пиридонового кольца также могут присоединяться боковые группы [26] (рис. 1).

Эти препараты используются при лечении заболеваний респираторного тракта, в том числе туберкулеза, кишечных и кожных инфекций, инфекций мочеполовой системы, костной и соединительной ткани.

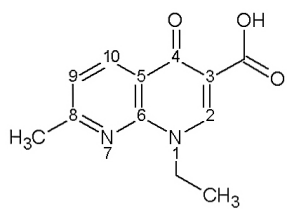
Мишенью фторхинолонов служат белки, участвующие в репликации ДНК, в частности ДНК-гираза, которая устраняет суперскрученность цепей ДНК, обеспечивая движение репликативной вилки, а также сходная с ней по структуре топоизомераза IV, которая участвует в расхождении дочерних хромосом. Фторхинолоны блокируют лигазную активность этих ферментов, что приводит к накоплению двухцепочных разрывов ДНК [26]. Таким образом, бактериостатический эффект фторхинолонов обусловлен остановкой репликации, а бактерицидный — двойными разрывами ДНК [31].

Наиболее часто используемая классификация фторхинолонов — разделение по поколениям, носящее условный характер. Препараты первого и второго поколений обладают более высоким сродством к лигирующему ДНК домену гиразы, чем к топоизомеразе IV; фторхинолоны третьего и четвертого поколения, которые также обладают сродством к лигазному домену топоизомеразы IV, более активны в отношении грамположительных бактерий [31]. К первому поколению относят нефторированные хинолоны: налидиксовую и оксолиновую кислоту, ко второму — пefлоксацин, офлоксацин, цiproфлоксацин, норфлоксацин, к третьему — левофлоксацин и спарфлоксацин. Моксифлоксацин, гемифлоксацин, гатифлоксацин и тровафлоксацин — фторхинолоны четвертого поколения. Для препаратов четвертого поколения характерна выраженная сопряженная ингибирующая активность в отношении гиразы и топоизомеразы IV (табл.). При использовании таких препаратов снижается риск развития резистентных вариантов [1, 40].

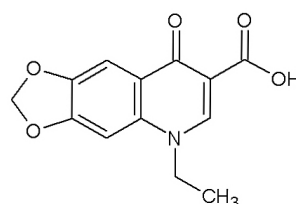
При существующих режимах антибактериальной терапии максимальная концентрация цiproфлоксацина в крови составляет 1,5 мкг/мл, офлоксацина — 4,0 мкг/мл, левофлоксацина — 6,0 мкг/мл, моксифлоксацина — 4,0 мкг/мл. Время полужизни цiproфлоксацина — 4 ч, офлоксацина — 4–5 ч, левофлоксацина — 6–8 ч, моксифлоксацина — 10–13 ч [69]. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) цiproфлоксацина и левофлоксацина для большинства микроорганизмов, в том числе микоплазм, составляет 1 мкг/мл. Для фторхинолонов новых поколений характерны более низкие значения МИК и длительное сохранение в крови в концентрациях выше МИК, что повышает эффективность терапии и снижает риск развития резистентных форм [61, 68].

В 1984 г., когда применение фторхинолонов еще только входило в клиническую практику, при тестировании 5994 изолятов 30 различных видов было найдено всего 37 устойчивых изолятов [4]. Спустя 30 лет доля устойчивых к фторхинолонам изолятов различных видов значительно возросла и составляет 10–25% в Европе и до 45% — в Гонконге [16]. Резистентные формы кишечной палочки, стрептококков и стафилококков появляются в организме на фоне терапии с применением фторхинолонов [15, 16]. Неконтролируемое или неадекватное применение фторхинолонов может внести существенный вклад в увеличение доли устойчивых вариантов патогенных бактерий, в том числе микоплазм.

I поколение – нефторированные хинолоны
I generation – nonfluorinated quinolones

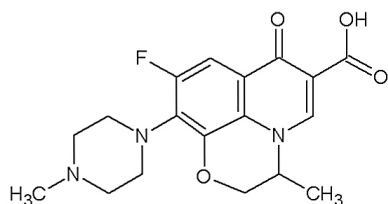


налидиксовая кислота
 nalidixic acid

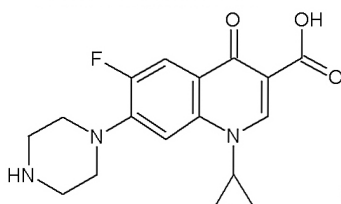


оксолиновая кислота
 oxalic acid

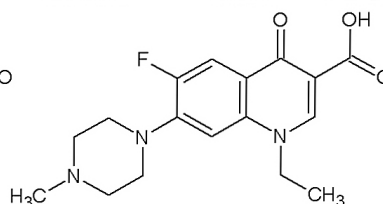
II поколение – «грамотрицательные» фторхинолоны
II generation – “gram-negative” quinolones



офлоксацин
 ofloxacin

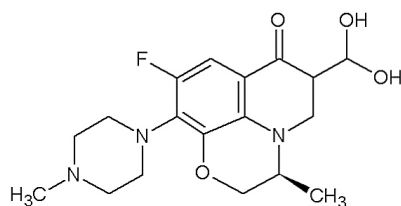


ципрофлоксацин
 ciprofloxacin

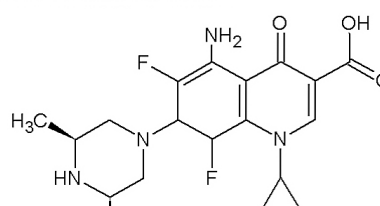


пепфлоксацин
 pefloxacin

III поколение – «респираторные» фторхинолоны
III generation – “respiratory” quinolones

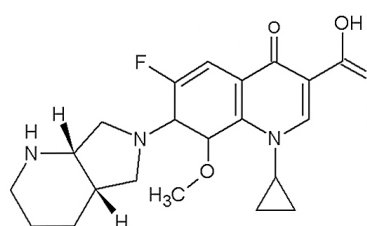


левофлоксацин
 levafloxacin

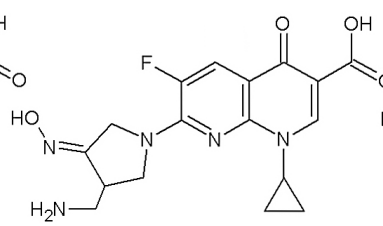


спарфлоксацин
 sparfloxacin

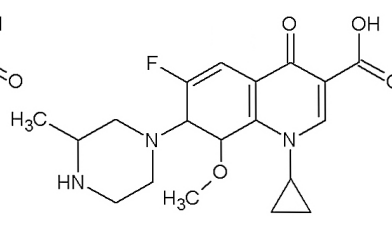
IV поколение – «респираторные» и «анаэробные» фторхинолоны
IV generation – “respiratory” and “anaerobic” quinolones



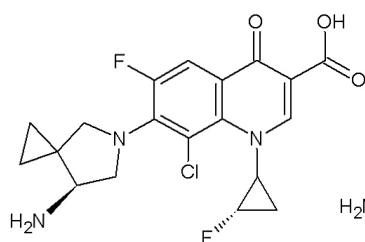
моксифлоксацин
 moxifloxacin



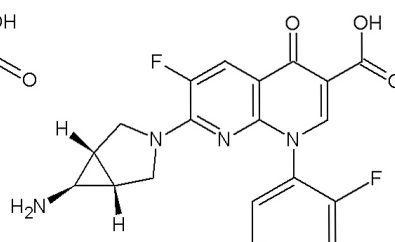
гемифлоксацин
 gemifloxacin



гатифлоксацин
 gatifloxacin



ситафлоксацин
 sitafloxacin



тровафлоксацин
 trovafloxacin

Рисунок 1. Структура хинолонов/фторхинолонов

Figure 1. Structure of quinolones/fluoroquinolones

Таблица. Поколения соединений ряда хинолонов/фторхинолонов

Table. Quinolone/fluoroquinolone generations

Поколение Generation	Показания для назначения Therapeutic indication	Молекулярные мишени Molecular targets
I поколение (нефторированные хинолоны) I generation (nonfluorinated quinolones)	Неосложненные инфекции мочевыводящих путей, вызванные грамотрицательными бактериями (кроме <i>P. aeruginosa</i>) Uncomplicated urinary tract infections caused by gram-negative pathogens (excluding <i>P. aeruginosa</i>)	Гиразида Gyrase
II поколение («граммотрицательные» фторхинолоны) II generation («gram-negative» quinolones)	Осложненные инфекции мочевыводящих путей и пиелонефриты; заболевания, передающиеся половым путем; простатит; инфекции кожи и мягких тканей, вызванные грамотрицательными бактериями и <i>Staphylococcus aureus</i> Complicated urinary tract infections and pyelonephritis; sexually transmitted diseases; prostatitis; skin and soft tissue infections caused by gram-negative pathogens and <i>Staphylococcus aureus</i>	Гиразида Gyrase
III поколение («респираторные» фторхинолоны) III generation («respiratory» quinolones)	Активны в отношении грамположительных патогенов; используются при пневмонии и обострениях хронического бронхита Effective against gram-positive pathogens, apply for acute exacerbations of chronic bronchitis, community-acquired pneumonia	Гиразида и топоизомераза IV Gyrase and topoisomerase IV
IV поколение («респираторные» и «анаэробные» фторхинолоны) IV generation («respiratory» and «anaerobic» quinolones)	Сфера применения сходна с фторхинолонами II поколения; trovafloxacin также одобрен для лечения интраабдоминальных инфекций и сепсиса Same application sphere as for second-generation agents; trovafloxacin is approved for complicated urinary tract infections and sepsis	Гиразида и топоизомераза IV Gyrase and topoisomerase IV

Целью данного обзора является рассмотрение механизмов, приводящих к развитию резистентности патогенных для человека микоплазм к фторхинолонам.

Мутации генов гиразы и топоизомеразы IV как основная причина устойчивости микоплазм к фторхинолонам

Возникновение мутаций генов субъединиц гиразы *gyrA/gyrB* и топоизомеразы IV *parC/parE* является наиболее изученным механизмом, обеспечивающим устойчивость патогенов к фторхинолонам. В генах, кодирующих субъединицы этих ферментов, имеются «горячие точки», в которых на фоне отбора в присутствии фторхинолонов у неродственных бактерий накапливаются сходные нуклеотидные замены, обеспечивающие развитие устойчивости к этим препаратам. Такие мутации приводят к заменам в составе активного центра фермента и его окружения.

Для разных бактерий значение тех или иных аминокислотных замен в данных участ-

ках молекул для развития устойчивости может быть различным. В случае *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* достаточно единичных мутаций для развития устойчивости к отдельным соединениям фторхинолонового ряда. Для возникновения устойчивых вариантов *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. и *N. gonorrhoeae* необходимо накопление нескольких мутаций [16, 43, 50]. Паттерн накопления мутаций отражает особенности воздействия фторхинолонов на микроорганизм конкретного вида. При накоплении мутаций, обеспечивающих устойчивость, в первую очередь возникают изменения в гене, кодирующем одну из субъединиц первичной мишени фторхинолонов, но в дальнейшем замены появляются и в генах вторичной мишени [3, 8, 39, 49, 62, 65].

Механизмы взаимодействия фторхинолонов с гиразой и топоизомеразой IV в целом идентичны и осуществляются на уровне комплекса ДНК и ДНК-связывающих доменов [52]. Субъединицы GyrA и ParC содержат N-концевой домен, обеспечивающий нанесение и репарацию двойных разрывов ДНК и C-концевой домен, через который

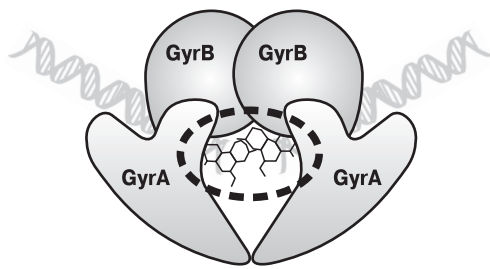


Рисунок 2. Схема связывания молекул хинолонов/фторхинолонов с ДНК-гиразой (на примере налидиксовой кислоты)

Figure 2. Quinolones/fluoroquinolones interaction with gyrase (in case of nalidixic acid)

Примечание. Область, замены в которой ведут к устойчивости к фторхинолонам, отмечена пунктиром.
Note. The site where amino acid changes lead to fluoroquinolone resistance is marked by pecked line.

в образовавшийся разрыв проходят двойные нити ДНК, что приводит к снятию суперскрученности молекулы. Субъединицы GyrB/ParE содержат N-терминальный домен, обладающий АТФазной активностью, а также С-терминальный домен, ответственный за взаимодействие с ДНК. Связывание гиразы с фторхинолонами определяется первую очередь полярными аминокислотными остатками в наружной области «карманов» белковых молекул, в которых находятся активные центры субъединиц GyrA и ParC [45, 51, 69]. Аминокислотные остатки С-концевого домена субъединиц GyrB и ParE расположены в участке, локализуемом вблизи белкового «кармана» GyrA/ParC, где связываются фторхинолоны, и их замены могут снижать восприимчивость к фторхинолонам за счет изменения конформации мишени [51, 69] (рис. 2). Большинство выявляемых вариантов, устойчивых к фторхинолонам, содержит множественные сочетанные мутации генов субъединиц гиразы и топоизомеразы, приводящие к заменам участвующих во взаимодействии с фторхинолонами аминокислотных остатков.

Влияние ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам мутаций на жизнеспособность бактерий слабо изучено. Мутации в генах *gyrA* и *parC* в участках, соответствующих сайтам связывания фторхинолонов в аминокислотной последовательности, не влияют на жизнеспособность кишечной палочки [54]. С другой стороны, мутации в тех же локусах приводят к замедлению роста *N. gonorrhoeae* [43], *S. typhimurium* (в данном случае одновременно снижается штамма) и *P. aeruginosa* [54].

Возможно, что снижение жизнеспособности и скорости роста, связанные с возникновением мутаций в генах гиразы и топоизомеразы IV, компенсируется за счет изменений за пределами геномных локусов, связанных с развитием устойчивости к фторхинолонам [43], поскольку и для *E. coli* и *P. aeruginosa* показано снижение активности гиразы после возникновения мутаций, приводящих к резистентности [54].

Основной мишенью фторхинолонов у микоплазм является топоизомераза IV. Накопление мутаций происходит быстрее, чем у других бактерий, из-за утраты 3'-5' экзонуклеазной активности их ДНК-полимеразы [5]. Такие мутации чаще всего приводят к заменам остатков серина и других полярных аминокислот в области, окружающей активные центры (в случае субъединиц GyrA и ParC) и остатков аминокислот в областях формирующих среду, окружающую реакционные центры GyrA и ParC (в случае GyrB и ParE). В целом набор мутаций у разных видов однотипен [46], хотя отмечаются некоторые особенности. Структура субъединиц гиразы и топоизомеразы у микоплазм отдельных видов может различаться [30], чем можно объяснить значительные вариации в восприимчивости к тем или иным фторхинолонам. У всех клинически значимых видов микоплазм выявлены замены в составе субъединиц гиразы и топоизомеразы IV, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам.

В ряде случаев единичные замены в аминокислотной последовательности субъединиц гиразы и топоизомеразы IV могут приводить к развитию резистентности. В частности, мутанты *M. genitalium* по ParC (характеризующиеся заменой глицина на цистеин или пролина на треонин в наружной части белкового «кармана», скрывающего реакционные центры), или по ParE (характеризующиеся заменой аспарагина на лизин в положении 466), полученные при селекции в присутствии ципрофлоксацина, обладали повышенной устойчивостью к ципрофлоксацину при МИК значительно превышающих терапевтические концентрации препарата. При тестировании устойчивости к гареноксацину, моксифлоксацину, гатифлоксацину, спарфлоксацину, тосуфлоксацину, левофлоксацину и норфлоксацину значение МИК повышалось в 44–16 раз по сравнению с исходной (что также превышает терапевтические концентрации этих препаратов в крови). В то же время все вышеуказанные мутанты были восприимчивы к сатифлоксацину [17].

Мутации, характерные для микоплазм кластера *pneumoniae*

Большинство фторхинолонов воздействует на топоизомеразу IV *M. genitalium*, хотя первичной мишенью гареноксаина является гираза [58]. Установлено также, что при появлении мутаций по гену топоизомеразы IV фермент может частично сохранять чувствительность к гатифлоксацину и моксифлоксацину; восприимчивость к левофлоксацину, как правило, утрачивается [83].

Клинические изоляты *M. genitalium* характеризуются разным паттерном мутаций, обеспечивающих устойчивость к фторхинолонам. Возможны единичные мутации гена *gyrA*, сочетанные мутации генов *gyrA* и *parC*, а также множественные мутации гена *parC* [72].

Особенностью развития резистентности у близкородственной *M. genitalium* микоплазмы *M. pneumoniae* служит высокая частота мутаций гена *gyrB* по сравнению с *gyrA* при селекции на устойчивость к фторхинолонам. Мутации по гену *parC*, ведущие к заменам полярных аминокислот по соседству с активными центрами, приводят к появлению устойчивых к спарфлоксацину штаммов. Двойные мутанты по генам *gyrA* и *parE* устойчивы к левофлоксацину, в свою очередь двойные мутанты по генам *parC* и *gyrB* устойчивы к моксифлоксацину, гатифлоксацину и цiproфлоксацину [29]. Низкая частота мутаций по гену *gyrA* объясняется утратой гидрофильных сайтов связывания фторхинолонов у представителей дикого типа этого вида [5].

Мутации, характерные для уреоплазм

В отличие от микоплазм кластера *pneumoniae*, у *U. urealyticum* и *U. parvum* аминокислотные замены в составе GyrB-субъединицы не выявляются, а в случае ParC-субъединицы они редки [22, 82]. Как правило, клинические изоляты, устойчивые к фторхинолонам норфлоксацину, пефлоксацину, офлоксацину и цiproфлоксацину, несут множественные точечные мутации генов *parC* и *gyrA*, в частности двойную мутацию гена *parC*, приводящие к заменам аланина на треонин в двух положениях внутри «кармана» молекулы, содержащего активные центры. При этом замены серина или глутамина на входе в «карман» ParC, характерные для большинства микоплазм, выявлялись реже. У большинства мутантов также имелись замены в области сайтов связывания фторхинолонов GyrA-субъединицы. При одинаковых профилях мутаций значения МИК фторхинолонов могут существенно различаться между штаммами [9].

Мутации, характерные для *M. hominis*

M. hominis отличается от других микоплазм структурой субъединицы ParC топоизомеразы IV. Этот белок имеет на несколько десятков аминокислотных остатков больше по сравнению со средним числом за счет удлинения N-концевого и C-концевого участков [6]. Однако у данного патогена описан типичный набор мутаций с заменами глутамина на глицин и серина на пролин у входа в «карман», скрывающий активные центры ParC. Такие замены являются наиболее частыми. Аналогичные мутации выявлены для GyrA, когда глутамин заменяется на лизин, а серин — на лейцин [5, 29]. Наличие множественных мутаций приводит к развитию устойчивости к норфлоксацину, пефлоксацину, офлоксацину, цiproфлоксацину, спарфлоксацину, левофлоксацину, гемифлоксацину и моксифлоксацину [9]. Для мутантов с заменой серина на лейцин на входе в «карман», содержащий активные центры гиразы, отмечена более выраженная устойчивость к спарфлоксацину по сравнению со штаммами с другими мутациями. Как у большинства бактерий, спонтанные мутации по гену *gyrA* происходят чаще, чем по гену *gyrB* [5]. Селекция устойчивых мутантов *in vitro* приводит к выявлению разных паттернов мутаций в зависимости от используемого препарата. При селекции на фоне левофлоксацина преобладающе накапливаются варианты с аминокислотными заменами в составе ParC и ParE, на фоне гемифлоксацина и гатифлоксацина — в составе GyrA и ParE. В присутствии гатифлоксацина также накапливаются мутанты по гену *parC*, а селекция на моксифлоксацине приводит к накоплению мутантов с сочетанными мутациями во всех четырех генах [29].

Участие систем множественной резистентности в реакции микоплазм на воздействие фторхинолонов

Системы множественной резистентности (англ. Multi Drug Resistance, MDR) широко распространены у патогенных бактерий. Хотя механизмы их действия могут быть различными, общим является удаление из клетки поступивших в нее токсичных соединений. Транспортёры данной группы характеризуют способность к экспорту через цитоплазматическую мембрану соединений широкого спектра, значительно различающихся по структуре. Бактерии, использующие для защиты от фторхинолонов такие экспортные системы, как правило, устойчивы к нескольким антибиотикам, а также к дезинфицирующим агентам [59].

Исследования устойчивых к фторхинолонам изолятов и селективированных в присутствии фторхинолонов устойчивых мутантов указывают на то, что штаммы одного вида с одним и тем же набором мутаций в генах субъединиц гиразы и топоизомеразы IV могут сильно различаться по уровням МИК, и что это во многом связано с MDR-системами [2, 60, 71]. У некоторых видов, в частности, *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивость к фторхинолонам может зависеть только от транспортеров при отсутствии аминокислотных замен в субъединицах гиразы [31].

В экскретировании фторхинолонов участвуют системы множественной резистентности, относящиеся к семействам ABC-транспортеров (ATP Binding Cassette), RND (Resistance-Nodulation-Division), MFS (Major Facilitator Superfamily) и MATE (Multidrug and Toxin Extrusion). У разных бактерий преобладающую роль могут играть разные семейства MDR-систем.

MDR-системы семейства ABC-транспортеров у патогенных микоплазм

Семейство ABC-транспортеров обеспечивает АТФ-зависимый экспорт и импорт. Транспортеры данного типа содержат по два гидрофильных нуклеотидсвязывающих домена, которые участвуют в гидролизе АТФ для получения энергии, за счет которой осуществляется транспорт через цитоплазматическую мембрану с участием транспортных доменов. Участие ABC-транспортеров в защите микоплазм от фторхинолонов описано на примере *M. hominis*. У этого вида обнаружены изоляты, со множественной устойчивостью: тетрациклины, макролиды и офлоксацин часто оказываются менее эффективными против изолятов *M. hominis*, устойчивых к ципрофлоксацину [85].

Фторхинолоны пассивно поступают в цитоплазму, особенно в среде с низким содержанием аргинина, являющегося основным источником энергии для этих микоплазм. У некоторых устойчивых изолятов после проникновения фторхинолонов в клетку они активно выводятся MDR-системами. Такой механизм защиты эффективен в отношении гидрофильных фторхинолонов ципрофлоксацина и норфлоксацина, но не против моксифлоксацина и пефлоксацина. Помимо фторхинолонов у таких изолятов выводятся антисептик акрифлавин и связывающийся с ДНК краситель бромистый этидий, что указывает на широкий спектр веществ в отношении которых специфичны транспортеры [63].

Для штаммов с повышенной экспрессией генов ABC-транспортеров характерна устойчи-

вость к ципрофлоксацину, а также бромистому этидию; устойчивости к доксициклину, джозамицину и хлорамфениколу у этих штаммов выявлено не было. Гены ABC-транспортеров *M. hominis* обозначаются как *md1* и *md2*. Схожие гены найдены у *M. genitalium* и *M. pneumoniae*, и их продукты могут выполнять аналогичную функцию [64]. У *M. genitalium* ABC-транспортеры участвуют также в ответе на осмотический стресс и в процессах, связанных с патогенезом [79, 88]. У *M. pneumoniae* обнаружена система транспорта макролидов MacB, относящаяся к семейству ABC [48].

Системы MDR из семейства ABC со сходной специфичностью, выводящие ципрофлоксацин, норфлоксацин, акрифлавин и бромистый этидий, выявлены и у других патогенов, в том числе *S. pneumoniae* [11]. Транспортеры группы ABC у *M. tuberculosis* способны к транспорту ципрофлоксацина и, в меньшей степени, норфлоксацина, моксифлоксацина и спарфлоксацина. На устойчивость к офлоксацину и левофлоксацину присутствие транспортера не влияет [69]. Активация экспрессии генов системы ABC происходит под воздействием фторхинолонов в дозозависимом режиме в ответ на повреждение ДНК [24].

Вторичные транспортеры, участвующие в экспорте фторхинолонов у бактерий и их возможное значение для лекарственной устойчивости у микоплазм

К вторичным транспортерам относят транспортеры, использующие трансмембранный электрохимический градиент в качестве источника энергии для переноса молекул через цитоплазматическую мембрану.

Участие вторичных транспортеров семейства MFS в защите от воздействия фторхинолонов описано у грамотрицательных [75, 86] и грамположительных бактерий [31, 44]. Эти транспортеры используют градиент протонов для транспорта через цитоплазматическую мембрану, поэтому при дефиците этого источника энергии их действие блокируется [25].

У *S. pneumoniae* и *B. cereus* найдены белки семейства MFS, участвующие в экспорте норфлоксацина и ципрофлоксацина; при этом экспрессия их генов не зависит от присутствия фторхинолонов [25, 73]. У *Listeria monocytogenes*, напротив, биосинтез белка семейства MFS, обеспечивающего устойчивость к фторхинолонам, активируется в присутствии соединенной данной группы [36]. В геноме *M. suis* имеется ген транспортера семейства MFS, однако его значение для экспорта фторхинолонов не установлено [20].

Системы МАТЕ характерны для грамотрицательных бактерий и вносят незначительный вклад в экспорт фторхинолонов по сравнению с системами других семейств [33, 86]. Как исключение, в геноме *M. meleagridis* выявлен ген белка этого семейства [67]. Функция продукта данного гена в настоящее время не выяснена. Системы множественной устойчивости семейства RND участвуют в выведении фторхинолонов из цитоплазмы у грамотрицательных бактерий, тогда как у микоплазм транспортеры этого типа отсутствуют [74].

Изменчивость по степени устойчивости к фторхинолонам, опосредованной работой транспортеров, может быть связана как с наличием или отсутствием соответствующих генов, так и с их полиморфизмом и полиморфизмом генов, продуктами которых являются регуляторные белки [12, 48]. Что именно служит причиной различий в уровне экспрессии генов *md1* и *md2* у резистентных и восприимчивых к фторхинолонам штаммов *M. hominis* и какова роль продуктов генов, сходных с генами MDR, найденных у других микоплазм, предстоит установить.

Роль дополнительных механизмов в развитии устойчивости к фторхинолонам у микоплазм

Помимо мутантных аллелей генов гиразы и топоизомеразы IV и MDR-систем у ряда бактерий обнаружены дополнительные механизмы, определяющие устойчивость к фторхинолонам. Прежде всего для многих бактерий альтернативой устойчивости является способность адаптации к фторхинолонам, связанная с замедлением метаболизма, репликации ДНК и деления клеток, а также формированием биопленок [13, 21, 70, 84].

Поскольку действие фторхинолонов направлено на ДНК, активация систем репарации важна для сохранения жизнеспособности [13, 21, 84]. Это было показано при исследовании влияния мутаций по гену *ncr*, продукт которого является репрессором системы репарации RecSBD, на устойчивость *Acinetobacter baumannii* к ципрофлоксацину. Описанные мутанты обладали повышенной устойчивостью к воздействию этого фторхинолона [34].

Изменение проницаемости под воздействием фторхинолонов снижает интенсивность поступления антимикробных соединений в клетку [19, 27, 76]. Например, повышенное содержание кардиолипидов, фосфатидилхолина и жирных кислот с разветвленными цепями у *S. aureus* при-

водит к снижению восприимчивости к ципрофлоксацину [77], а у *Coxiella burnetii* под действием фторхинолонов активируется 3-гидроксимиристоилдегидрогеназа, участвующая в биосинтезе жирных кислот, что также может быть связано с изменением состава мембраны [78]. Наиболее изученным механизмом изменения проницаемости мембраны под воздействием фторхинолонов является изменение количественного и качественного состава поринов наружной мембраны [13, 32], однако данный механизм реализуется только у грамотрицательных бактерий.

Единственным описанным у микоплазм дополнительным механизмом устойчивости к фторхинолонам при отсутствии мутаций является поступление в клетку извне мутантных аллелей генов субъединиц гиразы и топоизомеразы IV, а также их продуктов, содержащих аминокислотные замены. Эти молекулы содержатся в мембранных пузырьках, отделяющихся от мембраны устойчивых микоплазм. Полученный путем селекции на фоне повышенных концентраций ципрофлоксацина вариант фитопатогена *Acholeplasma laidlawii* отличался повышенной способностью к формированию мембранных пузырьков, отделяющихся от цитоплазматической мембраны во внешнюю среду. У него также имелась отсутствующая у исходного штамма замена серина на лейцин в 91-м положении субъединицы ParC топоизомеразы IV. Мембранные пузырьки содержали ДНК и белковые молекулы и, возможно, участвовали в горизонтальном переносе мутантной аллели гена *parC*, а также мутантной формы ParC-субъединицы гиразы [55]. При селекции резистентных к ципрофлоксацину вариантов данного вида были получены и другие мутанты с заменами в генах субъединиц гиразы, топоизомеразы, а также в генах, участвующих в репарации ДНК; отмечалось изменение уровня экспрессии белков, участвующих в транскрипции, репликации, рекомбинации, репарации; фолдинге белка; транспорте и метаболизме аминокислот, нуклеотидов и неорганических ионов, а также вирулентности. Ряд этих белков также был выявлен внутри мембранных пузырьков [56].

Других дополнительных механизмов устойчивости к фторхинолонам у микоплазм в настоящее время не описано. Внутриклеточная локализация некоторых бактерий этого рода может обеспечивать более высокую устойчивость к фторхинолонам. Из-за снижения эффективности фторхинолонов при повышенной кислотности возможна более слабая восприимчивость микоплазм, заселяющих органы выделительной и половой системы, к препаратам данного типа [13, 66].

Заключение

Как правило, инфекции, вызванные *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* и *Ureaplasma* spp. не несут угрозы жизни пациента, однако при заражении новорожденных и развитии заболеваний у пациентов с иммунодефицитами они могут представлять серьезную опасность и требуют своевременного и грамотного назначения терапии с учетом лекарственной восприимчивости патогена. В случае, когда пациент находится в состоянии иммуносупрессии, основными препаратами выбора являются фторхинолоны, поскольку только они обладают бактерицидным эффектом в отношении микоплазм.

Приобретение резистентности к фторхинолонам происходит в несколько стадий. При этом задействуются разные механизмы, в том числе накопление мутаций генов, продуктами которых являются белки-мишени фторхинолонов; изменение биосинтеза транспортеров, а также разнообразные, малоизученные у микоплазм дополнительные механизмы. У микоплазм приобретение резистентности подчиняется тем же закономерностям, что и у бактерий из других групп, хотя оно имеет индивидуальные черты у микоплазм разных видов. Для микоплазм основным механизмом являются аминокислотные замены в субъединицах гиразы и топоизомеразы IV. Ассоциированные с резистентностью к фторхинолонам мутации изучены и подробно описаны у патогенных для человека микоплазм. Это позволило в случае *M. genitalium* признать применимость молекулярных методов для оценки резистентности патогена к терапии, что отражено в рекомендациях по лечению вызванных этим микроорганизмом инфекций (2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections [35]).

Как у многих других бактерий, у микоплазм описано участие транспортеров в развитии устойчивости к фторхинолонам. Высокая устойчивость связана с повышенным биосинтезом транспортеров, однако конкретные факторы, влияющие на изменение содержания этих белков у микоплазм, в настоящее время не описаны. Вероятно, причиной являются мутации генов регуляторных белков или промоторных областей, как это показано у других микроорганизмов.

Понимание молекулярных основ устойчивости к фторхинолонам у микоплазм важно с практической точки зрения. Представители таких видов, как *M. genitalium* и *M. pneumoniae* практически не выделяются в культуру, и характеристика их устойчивости к противомикробным соединениям затруднена. В случае *M. genitalium* применимость молекулярных методов для оценки резистентности к терапии поддерживается рекомендациями профессионального сообщества, однако следует помнить, что согласно рекомендациям ВОЗ результат подобных тестов имеет силу только при выявлении мутации (отсутствие мутаций не указывает на восприимчивость штаммов). Поэтому ценность подобных диагностических исследований повышается при учете максимального количества факторов, связанных с резистентностью патогена.

Исследование дополнительных механизмов, обеспечивающих наряду с изменениями структуры гиразы и топоизомеразы устойчивость к фторхинолонам, позволит получать информативный результат при проведении молекулярно-биологических диагностических тестов, а также разработать эффективные схемы сочетанной терапии.

Список литературы/References

1. Чарушин В.Н., Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чупахин О.Н. Фторхинолоны: синтез и применение. М.: Физматиздат, 2014. 318 с. [Charushin V.N., Nosova E.V., Lipunova G.N., Chupahin O.N. Ftorkhinolony: sintez i primeneniye [Fluoroquinolones: synthesis and application]. Moscow: Pharmizdat, 2014, 318 p.]
2. Aathithan S., French G.L. Prevalence and role of efflux pump activity in ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, vol. 30, no. 6, pp. 745–752. doi: 10.1007/s10096-010-1147-0
3. Almahmoud I., Kay E., Schneider D., Maurin M. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009, vol. 64, no. 2, pp. 284–293. doi: 10.1093/jac/dkp173
4. Barry A.L., Jones R.N., Thornsberry C., Ayers L.W., Gerlach E.H., Sommers H.M. Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1984, vol. 25, no. 5, pp. 633–637.
5. Bebear C.M., Bové J.M., Bebear C., Renaudin J. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, vol. 41, no. 2, pp. 269–273.
6. Bébéar C.M., Charron A., Bové J.M., Bébéar C., Renaudin J. Cloning and nucleotide sequences of the topoisomerase IV parC and parE genes of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol. 42, no. 8, pp. 2024–2031.
7. Bébéar C., Pereyre S., Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol.*, 2011, vol. 6, no. 4, pp. 423–431. doi: 10.2217/fmb.11.18
8. Bébéar C.M., Renaudin H., Charron A., Bové J.M., Bébéar C., Renaudin J. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol. 42, no. 9, pp. 2304–2311.

9. Bébéar C.M., Renaudin H., Charron A., Clerc M., Pereyre S., Bébéar C. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, no. 10, pp. 3323–3325. doi: 10.1128/AAC.47.10.3323-3325.2003
10. Blanchard A., Bébéar C. The evolution of *Mycoplasma genitalium*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2011, Iss.: *The evolution of infectious agents in relation to sex*, pp. 61–64. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06418.x
11. Boncoeur E., Durmort C., Bernay B., Ebel C., Di Guilmi A.M., Croizé J., Vernet T., Jault J.M. PatA and PatB form a functional heterodimeric ABC multidrug efflux transporter responsible for the resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 39, pp. 7755–7765. doi: 10.1021/bi300762p
12. Chen P.E., Willner K.M., Butani A., Dorsey S., George M., Stewart A., Lentz S.M., Cook C.E., Akmal A., Price L.B., Keim P.S., Mateczun A., Brahmhatt T.N., Bishop-Lilly K.A., Zwick M.E., Read T.D., Sozhamannan S. Rapid identification of genetic modifications in *Bacillus anthracis* using whole genome draft sequences generated by 454 pyrosequencing. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 8:12397. doi: 10.1371/journal.pone.0012397
13. Cirz R.T., O’Neill B.M., Hammond J.A., Head S.R., Romesberg F.E. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 20, pp. 7101–7110. doi: 10.1128/JB.00807-06
14. Couldwell D.L., Tagg K.A., Jeffreys N.J., Gilbert G.L. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int. J. STD AIDS*, 2013, vol. 24, no. 10, pp. 822–828. doi: 10.1177/0956462413502008
15. De Lastours V., Cambau E., Guillard T., Marcade G., Chau F., Fantin B. Diversity of individual dynamic patterns of emergence of resistance to quinolones in *Escherichia coli* from the fecal flora of healthy volunteers exposed to ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 206, no. 9, pp. 1399–1406. doi: 10.1093/infdis/jis511
16. De Lastours V., Fantin B. Impact of fluoroquinolones on human microbiota. Focus on the emergence of antibiotic resistance. *Future Microbiol.*, 2015, vol. 10, no. 7, pp. 1241–1255. doi: 10.2217/fmb.15.40
17. Deguchi T., Kikuchi M., Yasuda M., Ito S. Sitafoxacin: antimicrobial activity against ciprofloxacin-selected laboratory mutants of *Mycoplasma genitalium* and inhibitory activity against its DNA gyrase and topoisomerase IV. *J. Infect. Chemother.*, 2015, vol. 21, no. 1, pp. 74–75. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.021
18. Deguchi T., Yasuda M., Horie K., Seike K., Kikuchi M., Mizutani K., Tsuchiya T., Yokoi S., Nakano M., Hoshina S. Drug resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* in female sex workers, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, vol. 21, no. 6, pp. 1062–1064. doi: 10.3201/eid2106.142013
19. Daikos G.L., Lolans V.T., Jackson G.G. Alterations in outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* associated with selective resistance to quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, vol. 32, no. 5, pp. 785–787.
20. Dietz S., Lassek C., Mack S.L., Ritzmann M., Stadler J., Becher D., Hoelzle K., Riedel K., Hoelzle L.E. Updating the proteome of the uncultivable hemotrophic *Mycoplasma suis* in experimentally infected pigs. *Proteomics*, 2016, vol. 16, no. 4, pp. 609–613. doi: 10.1002/pmic.201500238
21. Dörr T., Lewis K., Vulić M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.*, 2009, vol. 5, no. 12, e. 1000760. doi: 10.1371/journal.pgen.1000760
22. Duffy L., Glass J., Hall G., Avery R., Rackley R., Peterson S., Waites K. Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 4, pp. 1590–1591. doi: 10.1128/JCM.44.4.1590-1591.2006
23. Dybvig K., Voelker L.L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, vol. 50, pp. 25–57. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.25
24. El Garch F., Lismond A., Piddock L.J., Courvalin P., Tulkens P.M., Van Bambeke F. Fluoroquinolones induce the expression of patA and patB, which encode ABC efflux pumps in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, vol. 65, no. 10, pp. 2076–2082. doi: 10.1093/jac/dkq287
25. Escudero J.A., San Millan A., Gutierrez B., Hidalgo L., La Ragione R.M., AbuOun M., Galimand M., Ferrándiz M.J., Domínguez L., De la Campa A.G., Gonzalez-Zorn B. Fluoroquinolone efflux in *Streptococcus suis* is mediated by SatAB and not by SmrA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 12, pp. 5850–5860. doi: 10.1128/AAC.00498-11
26. Feio M.J., Sousa I., Ferreira M., Cunha-Silva L., Saraiva R.G., Queirós C., Alexandre J.G., Claro V., Mendes A., Ortiz R., Lopes S., Amaral A.L., Lino J., Fernandes P., Silva A.J., Moutinho L., De Castro B., Pereira E., Perelló L., Gameiro P. Fluoroquinolone-metal complexes: a route to counteract bacterial resistance? *J. Inorg. Biochem.*, 2014, no. 138, pp. 129–143. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.05.007
27. Fukuda H., Hosaka M., Hirai K., Iyobe S. New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, vol. 34, no. 9, pp. 1757–1761.
28. Gohara Y., Arai S., Akashi A., Kuwano K., Tseng C.C., Matsubara S., Matumoto M., Furudera T. In vitro and in vivo activities of Q-35, a new fluoroquinolone, against *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, vol. 37, no. 9, pp. 1826–1830.
29. Gruson D., Pereyre S., Renaudin H., Charron A., Bébéar C., Bébéar C.M. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 3, pp. 1190–1193. doi: 10.1128/AAC.49.3.1190-1193.2005
30. Hirose K., Kawasaki Y., Kotani K., Abiko K., Sato H. Characterization of a point mutation in the parC gene of *Mycoplasma bovirhinis* associated with fluoroquinolone resistance. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2004, vol. 51, no. 4, pp. 169–175. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00748.x
31. Hooper D.C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Updat.*, 1999, vol. 2, no. 1, pp. 238–255. doi: 10.1054/drup.1998.0068
32. Hooper D.C., Wolfson J.S., Souza K.S., Ng E.Y., McHugh G.L., Swartz M.N. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli*: characterization of nfxB and cfxB, two mutant resistance loci decreasing norfloxacin accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, vol. 33, no. 3, pp. 283–290.

33. Huguet A., Pensec J., Soumet C. Resistance in *Escherichia coli*: variable contribution of efflux pumps with respect to different fluoroquinolones. *J. Appl. Microbiol.*, 2013, vol. 114, no. 5, pp. 1294–1299. doi: 10.1111/jam.12156
34. Jacoby G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 41, pp. 120–126. doi: 10.1086/428052
35. Jensen J.S., Cusini M., Gomberg M., Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2016, vol. 30, no. 10, pp. 1650–1656. doi: 10.1111/jdv.13849
36. Jiang X., Zhou L., Gao D., Wang Y., Wang D., Zhang Z., Chen M., Su Y., Li L., Yan H., Shi L. Expression of efflux pump gene *lde* in ciprofloxacin-resistant foodborne isolates of *Listeria monocytogenes*. *Microbiol. Immunol.*, 2012, vol. 56, no. 12, pp. 843–846. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00506.x
37. Kawai Y., Miyashita N., Kubo M., Akaike H., Kato A., Nishizawa Y., Saito A., Kondo E., Teranishi H., Ogita S., Tanaka T., Kawasaki K., Nakano T., Terada K., Ouchi K. Therapeutic efficacy of macrolides, minocycline, and tosufloxacin against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 5, pp. 2252–2258. doi: 10.1128/AAC.00048-13
38. Kenny G.E., Hooton T.M., Roberts M.C., Cartwright F.D., Hoyt J. Susceptibilities of genital mycoplasmas to the newer quinolones as determined by the agar dilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, vol. 33, no. 1, pp. 103–107.
39. Kenny G.E., Young P.A., Cartwright F.D., Sjöström K.E., Huang W.M. Sparfloxacin selects gyrase mutations in first-step *Mycoplasma hominis* mutants, whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 10, pp. 2493–2496.
40. King D.E., Malone R., Lilley S.H. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am. Fam. Physician*, 2000, vol. 61, no. 9, pp. 2741–2748.
41. Krausse R., Schubert S. In vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma ssp.* isolated in Germany over 20 years. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, vol. 16, no. 11, pp. 1649–1655. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03155.x
42. Krieg N.R., Staley J.T., Brown D.R., Hedlund B.P., Paster B.J., Ward N.L., Ludwig W., Whitman W.B. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. 2nd Edition. NY: Springer-Verlag, 2011, 949 p.
43. Kunz A.N., Begum A.A., Wu H., D'Ambrozio J.A., Robinson J.M., Shafer W.M., Bash M.C., Jerse A.E. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 205, no. 12, pp. 1821–1829. doi: 10.1093/infdis/jis277
44. Kwak Y.G., Truong-Bolduc Q.C., Bin Kim H., Song K.H., Kim E.S., Hooper D.C. Association of *norB* overexpression and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013, vol. 68, no. 12, pp. 2766–2772. doi: 10.1093/jac/dkt286
45. Laponogov I., Sohi M.K., Veselkov D.A., Pan X.S., Sawhney R., Thompson A.W., McAuley K.E., Fisher L.M., Sanderson M.R. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009, vol. 16, no. 6, pp. 667–669. doi: 10.1038/nsmb.1604
46. Le Roy C., Hémin N., Pereyre S., Bébéar C. Fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, no. 9, pp. 1677–1679. doi: 10.3201/eid2209.160446
47. Legakis N.J., Tzouvelekis L.S., Makris A., Kotsifaki H. Outer membrane alterations in multiresistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* selected by ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, vol. 33, no. 1, pp. 124–127.
48. Li S., Sun H., Liu F., Zhao H., Zhu B., Lv N. Complete genome sequence of the macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strain C267 in China. *Genome Announc.*, 2016, vol. 4, no. 2: e00236-16. doi: 10.1128/genomeA.00236-16
49. Li X.Z. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, vol. 25, no. 6, pp. 453–463. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.04.002
50. Liu X., Boothe D.M., Thungrat K., Aly S. Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals. *Vet. Microbiol.*, 2012, vol. 161, no. 1–2, pp. 159–168. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.019
51. Lupala C.S., Gomez-Gutierrez P., Perez J.J. Molecular determinants of the bacterial resistance to fluoroquinolones: a computational study. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.*, 2013, vol. 9, no. 2, pp. 281–288. doi: 10.2174/15734099113099990004
52. Madurga S., Sánchez-Céspedes J., Belda I., Vila J., Giralt E. Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. *Chembiochem.*, 2008, vol. 9, no. 13, pp. 2081–2086. doi: 10.1002/cbic.200800041
53. Manhart L.E., Broad J.M., Golden M.R. *Mycoplasma genitalium*: should we treat and how? *Clin. Infect. Dis.*, 2011, no. 53, pp. 129–142. doi: 10.1093/cid/cir702
54. Marcusson L.L., Frimodt-Møller N., Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 8:1000541. doi: 10.1371/journal.ppat.1000541
55. Medvedeva E.S., Baranova N.B., Mouzykantov A.A., Grigorieva T.Y., Davydova M.N., Trushin M.V., Chernova O.A., Chernov V.M. Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target. *Scientific World J.*, 2014, vol. 2014:150615. doi: 10.1155/2014/150615
56. Medvedeva E.S., Davydova M.N., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Grigoreva T.Y., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Chernova O.A., Chernov V.M. Genomic and proteomic profiles of *Acholeplasma laidlawii* strains differing in sensitivity to ciprofloxacin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2016, vol. 466, pp. 23–27. doi: 10.1134/S1607672916010075
57. Mihai M., Valentin N., Bogdan D., Carmen C.M., Coralia B., Demetra S. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated during a population-based study concerning women infertility in northeast Romania. *Braz. J. Microbiol.*, 2011, vol. 42, no. 1, pp. 256–260. doi: 10.1590/S1517-83822011000100032
58. Nakatani M., Mizunaga S., Takahata M., Nomura N. Inhibitory activity of garenoxacin against DNA gyrase of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, vol. 67, no. 8, pp. 1850–1852. doi: 10.1093/jac/dks140
59. Pagedar A., Singh J., Batish V.K. Efflux mediated adaptive and cross resistance to ciprofloxacin and benzalkonium chloride in *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. *J. Basic Microbiol.*, 2011, vol. 51, no. 3, pp. 289–295. doi: 10.1002/jobm.201000292

60. Park S., Lee K.M., Yoo Y.S., Yoo J.S., Yoo J.I., Kim H.S., Lee Y.S., Chung G.T. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and activity of efflux pump in fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong Public Health Res. Perspect.*, 2011, vol. 2, no. 3, pp. 164–170. doi: 10.1016/j.phrp.2011.11.040
61. Poirel L., Cattoir V., Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol.*, 2012, vol. 3:24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00024
62. Puig C., Tirado-Vélez J.M., Calatayud L., Tubau F., Garmendia J., Ardanuy C., Marti S., de la Campa A.G., Liñares J. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 1, pp. 461–466. doi: 10.1128/AAC.04005-14
63. Raheison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Bébéar C., Bébéar C.M. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 3, pp. 672–679. doi: 10.1128/AAC.46.3.672-679.2002
64. Raheison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Bébéar C., Bébéar C.M. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 1, pp. 421–424. doi: 10.1128/AAC.49.1.421-424.2005
65. Reinhardt A.K., Kempf I., Kobisch M., Gautier-Bouchardon A.V. Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, vol. 50, no. 4, pp. 589–592. doi: https://doi.org/10.1093/jac/dkf158
66. Rice L.B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.*, 2012, vol. 87, no. 2, pp. 198–208. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.12.003
67. Rocha T.S., Bertolotti L., Catania S., Pourquier P., Rosati S. Genome sequence of a *Mycoplasma meleagridis* field strain. *Genome Announc.*, 2016, vol. 4, no. 2, pp. 16–17. doi: 10.1128/genomeA.00017-16
68. Rybak M.J. Pharmacodynamics: relation to antimicrobial resistance. *Am. J. Med.*, 2006, vol. 119, no. 6, pp. 62–70. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.227
69. Sahn D.F., Thornsberry C., Jones M.E., Karlowsky J.A. Factors influencing fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, vol. 9, no. 12, pp. 1651–1654. doi: 10.3201/eid0912.030168
70. Saroj S.D., Clemmer K.M., Bonomo R.A., Rather P.N. Novel mechanism for fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, vol. 56, no. 9, pp. 4955–4957. doi: 10.1128/AAC.00739-12
71. Sato T., Yokota S., Okubo T., Ishihara K., Ueno H., Muramatsu Y., Fujii N., Tamura Y. Contribution of the AcrAB-TolC efflux pump to high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and humans. *J. Vet. Med. Sci.*, 2013, vol. 75, no. 4, pp. 407–414.
72. Shimada Y., Deguchi T., Nakane K., Masue T., Yasuda M., Yokoi S., Ito S., Nakano M., Ito S., Ishiko H. Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, vol. 36, no. 3, pp. 255–258. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.05.011
73. Simm R., Vörös A., Ekman J.V., Södring M., Nes I., Kroeger J.K., Saidijam M., Bettaney K.E., Henderson P.J., Salkinoja-Salonen M., Kolstø A.B. BC4707 is a major facilitator superfamily multidrug resistance transport protein from *Bacillus cereus* implicated in fluoroquinolone tolerance. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 5:36720. doi: 10.1371/journal.pone.0036720
74. Smith J.L., Fratamico P.M. Fluoroquinolone resistance in campylobacter. *J. Food Prot.*, 2010, vol. 73, no. 6, pp. 1141–1152.
75. Swick M.C., Morgan-Linnell S.K., Carlson K.M., Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 2, pp. 921–924. doi: 10.1128/AAC.00996-10
76. Tagg K.A., Jeffreys N.J., Couldwell D.L., Donald J.A., Gilbert G.L. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 7, pp. 2245–2249. doi: 10.1128/JCM.00495-13
77. Tkachenko O., Shepard J., Aris V.M., Joy A., Bello A., Londono I., Marku J., Soteropoulos P., Peteroy-Kelly M.A. A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. *Res. Microbiol.*, 2007, vol. 158, no. 8–9, pp. 651–658. doi: 10.1016/j.resmic.2007.09.003
78. Vranakis I., De Bock P.J., Papadioti A., Tselentis Y., Gevaert K., Tsiotis G., Psaroulaki A. Identification of potentially involved proteins in levofloxacin resistance mechanisms in *Coxiella burnetii*. *J. Proteome Res.*, 2011, vol. 10, no. 2, pp. 756–762. doi: 10.1021/pr100906v
79. Wasinger V.C., Pollack J.D., Humphery-Smith I. The proteome of *Mycoplasma genitalium*. Chaps-soluble component. *Eur. J. Biochem.*, 2000, vol. 267, no. 6, pp. 1571–1582. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01183.x
80. Weinstein S.A., Stiles B.G. Recent perspectives in the diagnosis and evidence-based treatment of *Mycoplasma genitalium*. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2012, vol. 10, no. 4, pp. 487–499. doi: 10.1586/eri.12.20
81. Wolfson J.S., Hooper D.C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1985, vol. 28, no. 4, pp. 581–586.
82. Xie X., Zhang J. Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in Chinese patients. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, vol. 259, no. 2, pp. 181–186. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00239.x
83. Yamaguchi Y., Takei M., Kishii R., Yasuda M., Deguchi T. Contribution of topoisomerase IV mutation to quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 4, pp. 1772–1776. doi: 10.1128/AAC.01956-12
84. Yamane T., Enokida H., Hayami H., Kawahara M., Nakagawa M. Genome-wide transcriptome analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Urol.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 360–368. doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02933.x
85. Yamazaki T., Sasaki T., Takahata M. Activity of Garenoxacin against Macrolide-Susceptible and -Resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, no. 6, pp. 2278–2279. doi: 10.1128/AAC.01561-06
86. Yang S., Clayton S.R., Zechiedrich E.L. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, vol. 51, no. 3, pp. 545–556. doi: https://doi.org/10.1093/jac/dkg126

87. Ye G., Jiang Z., Wang M., Huang J., Jin G., Lu S. The resistance analysis of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female reproductive tract specimens. *Cell Biochem. Biophys.*, 2014, vol. 68, no. 1, pp. 207–210. doi: 10.1007/s12013-013-9691-8
88. Zhang W., Baseman J.B. Transcriptional response of *Mycoplasma genitalium* to osmotic stress. *Microbiology*, 2011, vol. 157, no. 2, pp. 548–556. doi: 10.1099/mic.0.043984-0

Автор:

Ваганова А.Н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Author:

Vaganova A.N., Junior Researcher, Laboratory of Biomolecular Technologies, Department of New Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.05.2017
Отправлена на доработку 15.05.2017
Принята к печати 20.06.2017

Received 05.05.2017
Revision received 15.05.2017
Accepted 20.06.2017

THE OCCURRENCE OF THE MARKERS OF HEPATITIS C AMONG PRACTICALLY HEALTHY RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA: A PILOT STUDY

O.V. Kalinina^a, E.V. Lichnaia^a, M.Y. Boiro^b, Areg A. Totolian^a

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

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

Abstract. Phylogeographical and philodinamic studies have shown that the hepatitis C virus began to circulate in the human population about 500–2000 years ago on the African continent and only in the 20th century, this virus received the ubiquitous distribution. According to WHO in the world more than 71 million people are chronically infected by the hepatitis C virus, more than half of them live in Africa and South-East Asia. At the same time, the actual prevalence of hepatitis C in most countries of sub-Saharan Africa, including the Republic of Guinea, remains poorly understood. The aim of this study was to evaluate the occurrence of serological and molecular markers of hepatitis C on a random small selection of blood samples obtained from healthy adults of the Republic of Guinea. Materials and methods. Serum and plasma blood samples obtained from thirty one healthy adults of 24–71 years old of the Republic of Guinea were examined. Blood samples were collected in 2015–2016 years. The serum samples were analyzed for the presence of total anti-HCV (IgG+IgM), of specific antibodies to the core, the NS3, the NS4 and the NS5B HCV proteins, of core antigene with “DS-ELISA-ANTI-HCV-GM”, “DS-ELISA-ANTI-HCV-SPEKTRE-GM”, “DS-ELISA-HCV-Ag” detection kits (RPC “Diagnostic Systems”, Russia), respectively. RNA HCV were detected by RT-PCR with detection kit “AmpliSens HCV-FRT” (CRIE, Moscow) and by nested-PCR using the primers from 5’UTR region. HCV genotypes were determined by RT-PCR with detection kit “AmpliSens HCV-genotype FRT” (CRIE, Moscow) and by phylogenetic analysis based on the 5’UTR region. Results and discussion. In this pilot study, the presence of HCV markers was confirmed in 3 (9.68%, 95% CI 3.35–24.90) of 31 examined persons. Two of them had RNA HCV. Based on the phylogenetic analysis of the 5’UTR region of the HCV genome, the isolate obtained from person No. 5 belonged to genotype 1, and the isolate obtained from person No. 6 belonged to genotype 2. The obtained results together with the analyzed literature data indicate a significant burden of hepatitis C in the Republic of Guinea, and also indicate the need to develop both an algorithm of diagnostic criteria and the improvement of diagnostic test systems for mass screening of the African population in order to establish the proportion of persons involved in epidemic process.

Key words: hepatitis C virus, Republic of Guinea, serological markers, molecular markers, genotype, diagnostic test systems.

Адрес для переписки:

Калинина Ольга Викторовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-29-41 (служебн.); +7 921 746-39-07 (моб.).
E-mail: olgakalinina@mail.ru

Contacts:

Olga V. Kalinina
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-29-41 (office); +7 921 746-39-07 (mobile).
E-mail: olgakalinina@mail.ru

Библиографическое описание:

Калинина О.В., Личная Е.В., Буаро М.И., Тотолян Арег А. Встречаемость маркеров вируса гепатита С у практически здоровых жителей Гвинейской Республики: пилотное исследование // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 245–250. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-245-250

Citation:

Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Boiro M.Y., Totolian Areg A. The occurrence of the markers of hepatitis C among practically healthy residents of the Republic of Guinea: a pilot study // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 245–250. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-245-250

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ МАРКЕРОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

О.В. Калинина¹, Е.В. Личная¹, М.Й. Буаро², Арег А. Тотолян¹

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

²НИИ прикладной биологии Гвинеи, г. Кинди, Гвинейская Республика

Резюме. Филогеографические и филодинамические исследования показали, что вирус гепатита С начал циркулировать в человеческой популяции около 500–2000 лет тому назад на африканском континенте, но лишь в XX веке получил убиквитарное распространение. Согласно расчетным данным ВОЗ на 2017 г. в мире более 71 млн человек хронически инфицировано вирусом гепатита С, более половины из которых проживает на территории Африки и Юго-Восточной Азии. При этом до сих пор фактическая распространенность вируса гепатита С в большинстве стран Африки южнее Сахары, в том числе в Гвинейской Республике, остается малоизученной. Цель исследования: оценить встречаемость серологических и молекулярных маркеров гепатита С на случайной малой выборке образцов крови, полученных от практически здоровых жителей Гвинейской Республики. *Материалы и методы.* Изучены образцы сыворотки и плазмы крови, полученные в 2015–2016 гг. от 31 практически здорового жителя Гвинейской Республики в возрасте от 24 до 71 года. Наличие суммарных анти-НСV (IgG+IgM), специфических антител к core, NS3, NS4 и NS5 белкам, свободного core антигена определяли методом ИФА с использованием тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-НСV», «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-GM», «ДС-ИФА-НСV-АГ» (ООО «Диагностические системы», Россия) соответственно. Детекцию РНК ВГС проводили двумя методами: ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-системы «АмплиСенс НCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и методом гнездовой ПЦР с праймерами из 5'UTR области генома. Генотипы изолятов ВГС определяли методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием «АмплиСенс НCV-генотип-FL» вариант 1–6, определяющей генотипы 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a, 6 (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), а также на основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей из 5'UTR области генома. *Результаты и обсуждение.* В данном пилотном исследовании наличие маркеров ВГС подтверждено у 3 (9,68%, 95% CI 3,35–24,90) из 31 обследованного. У двух из них обнаружена РНК ВГС. На основе филогенетического анализа 5'UTR области генома изолят, полученный от пациента № 5, принадлежал к генотипу 1, а изолят, полученный от пациента № 6, — к генотипу 2. Полученные результаты в совокупности с проанализированными литературными данными свидетельствуют о существенном бремени гепатита С в Гвинейской Республике, а также указывают на необходимость разработки как алгоритма диагностических критериев, так и совершенствования диагностических тест-систем для проведения массового скрининга африканского населения с целью установления доли вовлеченных в эпидемический процесс лиц.

Ключевые слова: вирус гепатита С, Гвинейская Республика, серологические маркеры, молекулярные маркеры, генотип, диагностические тест-системы.

Introduction

According to the World Health Organization, more than 71 million people globally are chronically infected with the hepatitis C virus (HCV), about 399 thousand people die of liver diseases associated with hepatitis C (HC) every year [17]. Hepatitis C virus is one of the most dynamically evolving pathogens, which makes it difficult to develop effective immunoprophylactic vaccines and allows the virus to successfully adapt to the effects of immune defense factors of the human body, contributing to a significant incidence of the disease chronicity.

Despite the significant genetic variability of HCV, only 6 subtypes (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a) are recognized as epidemic variants, which provided the ubiquitous propagation of the pathogen during the 20th century [1]. The remaining HCV subtypes are characterized by local geographical ranges, mainly in Africa and South-East Asia, where, as a rule, none of the six epidemic variants of the virus are dominant.

The overall HCV infection of the population of the Sub-Saharan Africa is high [10]. A wide range of HCV variants have been found in Africa: genotypes 1 and 4 in Central Africa; genotypes 2 and 4 in North Africa; and genotype 2 in West Africa and Cameroon [1, 2, 8, 9, 12, 14]. The study of the HC virus evolution indicates that most of its subtypes occurred more than 300 years ago on the African continent, which is now considered a potential pool of “future” epidemic variants of HCV. At the same time, due to economic and social reasons, the prevalence and genetic diversity of HCV, the route of the pathogen transmission, as well as the clinical course of the infection in many countries of sub-Saharan Africa, including the Republic of Guinea, still remain understudied.

The aim of the study was to evaluate the occurrence of serological and molecular markers of hepatitis C on a random small batch of blood samples obtained from practically healthy residents of the Republic of Guinea.

Materials and Methods

The work studies samples of blood serum and plasma, obtained in 2015–2016 from 31 practically healthy inhabitants of the Republic of Guinea at the age from 24 to 71 years. All samples of serum and plasma were obtained for scientific research under the code names according to the Declaration of Helsinki under the protocol of the Ethics Committee of the Saint-Petersburg Pasteur Institute. After taking the biomaterial, all samples were aliquoted and stored at -70°C until the study was performed.

The presence of total antibodies to the hepatitis C virus (anti-HCV IgG + IgM) was determined using the DS-EIA-ANTI-HCV (RPC “Diagnostic Systems”, Russia), and having international certificates of CE products. The samples that revealed reactivity for the presence of total anti-HCV were retested in duplicate using the same method. The presence of specific antibodies (IgG + IgM) to the structural (core) and nonstructural (NS3, NS4, NS5) proteins of the hepatitis C virus (HCV) was confirmed using the DS-EIA-ANTI-HCV-SPECTRUM-GM test system (RPC “Diagnostic Systems”, Russia). The presence of free core HCV antigen (Ag core) was assessed by EIA method using the DS-EIA-HCV-AG test system (RPC “Diagnostic Systems”, Russia), which is designed to detect the core HCV antigen in the absence of anti-HCV in blood plasma and serum samples.

Total RNA was released from 100 μl of blood plasma/serum sample using the “AmpliPrime Ribo-Sorb” and “AmpliPrime Ribo-Prep” commercial kits (CRIE, Moscow) according to the manufacturer’s instructions. Total RNA was stored at -70°C . The reverse transcription reaction was performed using the “Reverta L” commercial kit (CRIE, Moscow) according to the manufacturer’s instructions, or using 100 units of MMLV reverse transcriptase enzyme (Eurogen, Russia) and 20 μM of random primers in 20 μl of reaction mixture containing 10 mM of each of the nucleoside triphosphates (dNTP), 10 mM of DTT, and 10 units of Rnazin. The reverse transcription reaction was performed during 1 hour at 42°C .

The study of the biological material for the presence of HCV RNA was carried out by two methods: by real-time PCR method using the “AmpliSens HCV-FL” commercial test system (CRIE, Moscow), according to the instructions, in the Rotor-Gene 6000 amplifier (Corbett Research, Australia), and by nested PCR method with primers from the most conserved region of the 5’UTR genome as described previously [7]. The products of nested PCR were visualized in 2% agarose gel with the addition of ethidium bromide in ultraviolet light. The fragment size after the second stage of PCR with internal primers from the 5’UTR region made up 235 base pairs (bp).

The genotypes of HCV isolates were determined by real-time RT-PCR using the commercial “AmpliSens HCV-Genotype-FL” ver. 1–6 test

system, which determines the 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a, 6 genotypes (CRIE, Moscow), as well as by method of phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the 5’UTR region of the genome. In the latter case, the products obtained as a result of nested PCR were purified using the AxyPrep PCR Clean-up Kit commercial panel (Axygen, Biosciences). The limited sequencing reaction was performed using BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Kits (PE Biosystems, ver. 3.1) and 4 pmol of the corresponding primer. The capillary electrophoresis was performed on the ABI PRISM 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, USA). The analysis of nucleotide sequences was performed using the Mega ver. 6.0 software. The phylogenetic analysis was performed by the Maximum Likelihood method in the Mega ver. 6.0 software. For the genotyping of isolates obtained from the residents of the Republic of Guinea, a sample of reference nucleotide sequences of HCV isolates was generated using the BLAST on-line software, including all sequences from the 5’UTR region of the genome of isolates obtained from the residents of the Republic of Guinea and recorded in GenBank.

The obtained data were processed by standard methods of statistical processing of digital material: the confidence limits (95% CI) were calculated using the Wilson method.

Results and Discussion

Of the 31 persons examined using the “DS-EIA-ANTI-HCV” test system, six persons were revealed to have positive results for the presence of anti-HCV in their blood serum samples, while the remaining 25 examined persons had anti-HCV negative samples. No free core antigen was detected in any blood serum sample using the “DS-EIA-HCV-AG” test system.

The presence of specific antibodies to several HCV proteins was found in five of six anti-HCV positive samples using the “DS-EIA-ANTI-HCV-SPECTRUM-GM” confirmatory test (Table). In this case, antibodies to the core protein with a high cut-off index (COI) greater than 8 were found only in two samples (No. 5 and No. 6). Antibodies to all the four HCV core, NS3, NS4 and NS5 proteins were detected in one sample (No. 4). However, the antibodies to the core protein in this sample had COI less than 2.0. At the same time, antibodies to the NS3 protein with COI greater than 10 and antibodies to the NS4 protein with COI less than 2.0 were detected in the sample No. 3. Antibodies to NS3 and NS5 proteins with average COI were detected in the sample No. 1. Antibodies only to the NS3 protein were detected in the sample No. 2. In our opinion, the presence of basically antibodies to the NS3 protein in samples No. 1, 2 and 3, as well as the absence of antibodies to the core protein, may indicate the presence of false-positive results of serodiagnosis.

Table. The results of HCV markers detection in blood serum/plasma samples obtained from practically healthy residents of the Republic of Guinea

Patient No.	Anti-HCV (COI*)	Anti-core (COI)	Anti-NS3 (COI)	Anti-NS4 (COI)	Anti-NS5 (COI)	HCV RNA
1	+ (5.0)	-	+ (5.69)	-	+ (2.94)	-
2	+ (4.03)	-	+ (6.33)	-	-	-
3	+ (12.68)	-	+ (10.73)	± (1.46)	-	-
4	+ (5.42)	± (1.21)	+ (5.27)	+ (4.83)	+ (2.53)	-
5	+ (9.87)	+ (8.0)	± (1.13)	-	-	+
6	+ (16.4)	+ (8.83)	± (1.18)	+ (3.06)	-	+

Notes. * COI (cutoff index) = OD of the sample/critical OD; "±" the result is equivocal, "+" the result is positive, "-" the result is negative.

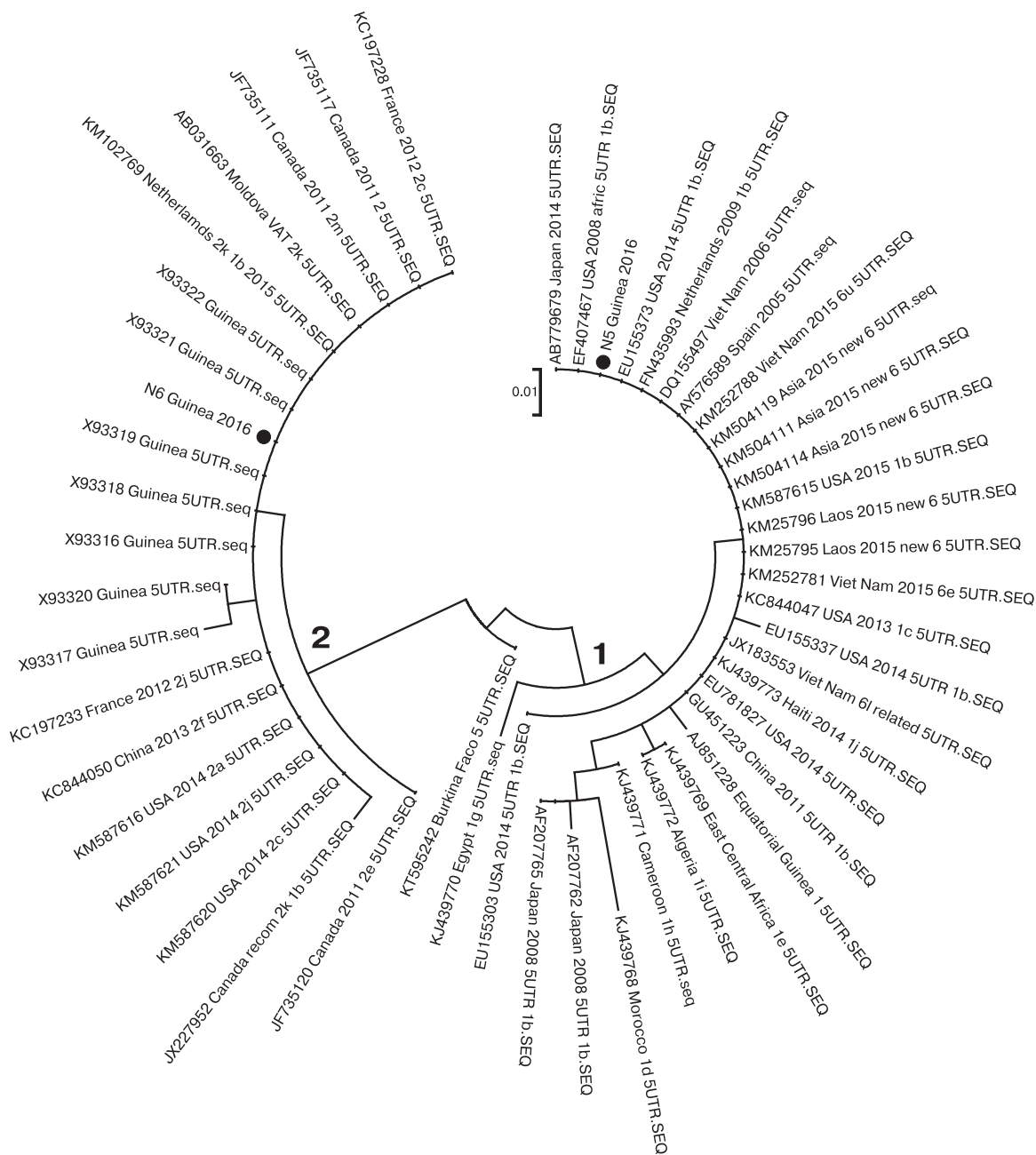


Figure. The phylogenetic tree based on 165 base nucleotides from the 5'UTR region of the HCV genome using the Maximum Likelihood method in the Mega 6.0 software

Notes. Guinean isolates obtained in 2016 are marked with a black circle. Figures indicate the branches formed by HCV isolates of genotypes 1 and 2.

The presence of a large number of false-positive results of HCV serodiagnosis is an actual problem on the African continent, as noted in a number of studies [11, 16]. For example, in the study of 1000 samples of blood serum obtained from residents of Rakaya (Uganda), the presence of anti-HCV was detected in 7.6% of samples using the Ortho ver. 3.0 commercial test system (Ortho Clinical Diagnostics, Denmark). At the same time, HCV RNA was not detected in any of the anti-HCV positive samples using the Abbott RealTime HCV Assay commercial test system (Abbott Molecular Inc.) [11]. The work makes the assumption of the probability of false-positive results due to a possible cross-reaction associated with the *Schistosoma mansoni* infection, which is widespread on the African continent. In favor of a large number of false-positive results, this study also showed no evidence of liver fibrosis in all anti-HCV positive patients [11]. In the study by Tagny et al. (2014) among 1998 blood samples obtained from blood donors in Cameroon, 86 samples (4.3%) were revealed to be anti-HCV positive using the HCV Rapid Test (Human Diagnostics, Germany) and/or Monolisa HCV Ag/Ab Ultra (BioRad, France). Of the 86 anti-HCV positive samples, only 37 were confirmed as positive, 29 as negative and 20 samples remained equivocal using HCV Immunoblot RIBA3 (Ortho Clinical Diagnostica, France) confirmatory test and/or TaqMan HCV (Roch Molecular Diagnostics, France, limit 25 copies/ml) [16].

In our study, HCV RNA was revealed in one of 31 patients examined by real-time RT-PCR using the “AmpliSens HCV-FL” commercial test system. However, we failed to establish the genotype using the “AmpliSens HCV-Genotype-FL” test system. At the same time, HCV RNA was detected in two (No. 5 and No. 6) of the 31 patients examined by nested PCR method with specific primers from the 5'UTR region. The nucleotide sequence for both HCV isolates was determined. Based on the phylogenetic analysis of the 5'UTR region of the genome, the isolate obtained from the patient No. 5 belonged to the genotype 1, and the isolate obtained from the patient No. 6 belonged to the genotype 2 (Fig.).

Thus, the combination of data in this study confirmed the presence of HCV markers in 3 (9.68%, 95% CI 3.35–24.90) of the 31 examined patients. The results obtained for other three patients require further observation and specification.

According to previous studies, HCV seroprevalence in the Republic of Guinea ranges from 2.6% in pregnant women to 15% among people at risk — patients with chronic kidney diseases. For example, in a survey carried out in 1996, anti-HCV was detected in 6.7% of 1421 examined patients aged 16 to 45 years (blood donors, pregnant women, patients from polyclinics and clinics) in the city of Conakry [15]. Among patients from polyclinics and clinics

in Conakry, the infection was as high as 8.6%, among blood donors it was 4.4%, and the lowest prevalence of 2.6% was detected among pregnant women [15]. Of the 579 patients with chronic kidney diseases monitored during 2009–2013 in the only nephrological center of the Republic of Guinea, 15% had anti-HCV [3].

The available data on the HCV seroprevalence in African countries indicate quite pronounced territorial differences in the intensity of the epidemic process in different regions of the whole African continent and within individual countries, which is connected, inter alia, with national traditions characteristic of certain ethnic groups. For example, the prevalence of HCV markers in various regions of Nigeria ranges from 1.9% among pregnant women in Benin to 15% in isolated rural communes [5, 13]. According to the meta-analysis by Gower et al. (2014), HCV seroprevalence in West Africa averages 5.3% (95% CI 2.9–9.1), in Central Africa — 4.2% (95% CI 2.4–9.2), in East Africa — 1.0% (95% CI 0.6–3.1) and in South Africa — 1.3% (95% CI 0.8–2.5) [6]. In the study by Mora et al. (2016) based on the analysis of data reported for 2000–2013, HCV seroprevalence averages 4.14% (95% CI 3.25–5.20) in West African countries; 7.82% (95% CI 5.29–11.43) in Central African countries; 3% (95% CI 2.23–4.02) in the countries of East Africa; and 0.72% (95% CI 0.33–1.54) in the countries of South Africa [10]. In general, due to the absence of mass screening and recording of viral hepatitis C cases in developing countries, it is difficult to estimate the dynamics of the epidemic process, and the actual spread of HCV in sub-Saharan Africa in modern conditions of active population migration may be higher than the estimated average. This is supported by the data obtained in the examination of 14 205 African immigrants aged 15 to 58 years in the 2013–2015 period in official national camps organized in Libya [4]. The HCV seroprevalence averaged 8.1% among 4,993 immigrants from West Africa, 5.7% among 2557 immigrants from Central Africa, 8.4% among 3524 immigrants from East Africa, and 10.0% among 3131 immigrants from North Africa [4].

Conclusion

Despite a small sample batch, the results obtained in conjunction with the analyzed reported data indicate a significant burden of hepatitis C in the Republic of Guinea, and also point to the need both to develop an algorithm of diagnostic criteria and to improve the diagnostic test systems for mass screening among the African population with a view to establishing the proportion of people involved in the epidemic process. Undoubtedly, a large-scale comprehensive screening study will allow to assess the actual HCV prevalence among various groups of population in the Republic of Guinea.

References

1. Жебрун А.Б., Калинина О.В. Вирусный гепатит С: эволюция эпидемического процесса, эволюция вируса // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2016. № 1. С. 102–112. [Zhebrun A.B., Kalinina O.V. Viral hepatitis C: evolution of the epidemiologic process, evolution of the virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 1, pp. 102–112. (In Russ.)]
2. Калинина О.В. Вирус гепатита С: механизмы изменчивости, классификация, эволюция // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 5. С. 5–10. [Kalinina O.V. Hepatitis C virus: variability mechanisms, classification, evolution. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 5, pp. 5–10. (In Russ.)]
3. Bah A.O., Lamine C., Balde M.C., Bah M.L., Rostaing L. Epidemiology of chronic kidney diseases in the Republic of Guinea; future dialysis needs. *J. Nephrothol.*, 2015, vol. 4, no. 4, pp. 127–133. doi: 10.12860/jnp.2015.24
4. Daw M.A., El-Bouzedi A., Ahmed M.O., Dau A.A., Agnan M.M. In association with the Libyan Study Group of Hepatitis & HIV. Epidemiology of hepatitis C virus and genotype distribution in immigrants crossing to Europe from North and sub-Saharan Africa. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2016, vol. 14, no. 5, pp. 517–526. doi: 10.1016/j.tmaid.2016.05.020
5. Forbi J.C., Purdy M.A., Campo D.S., Vaughan G., Dimitrova Z.E., Ganova-Raeva L.M., Xia G.L., Khudyakov Y.E. Epidemic history of hepatitis C virus infection in two remote communities in Nigeria, West Africa. *J. Gen. Virol.*, 2012, vol. 93, pt. 7, pp. 1410–1421. doi: 10.1099/vir.0.042184-0
6. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2014, vol. 1, suppl. 1, pp. S45–S57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027
7. Kalinina O., Norder H., Vetrov T., Zhdanov K., Barzunova M., Plotnikova V., Mukomolov S., Magnius L. Shift in predominating subtype of HCV from 1b to 3a in St. Petersburg mediated by increase in injecting drug use. *J. Med. Virol.*, 2001, vol. 65, pp. 517–524. doi: 10.1002/jmv.20666
8. Markov P.V., Pepin J., Frost E., Deslandes S., Labbe A.-C., Pybus O.G. Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. *J. Gen. Virol.*, 2009, vol. 90, no. 9, pp. 2086–2096. doi: 10.1099/vir.0.011569-0
9. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 77–87. doi: 10.1002/hep.27259
10. Mora N., Adams W.H., Kliethermes S., Dugas L., Balasubramanian N., Sandhu J., Nde H., Small C., Jose J., Scaglione S., Layden J.E. A Synthesis of Hepatitis C prevalence estimates in Sub-Saharan Africa: 2000–2013. *BMC Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, pp. 283. doi: 10.1186/s12879-016-1584-1
11. Mullis C.E., Laeyendecker O., Reynolds S.J., Ocamo P., Quinn J., Boaz I., Gray R.H., Kirk G.D., Thomas D.L., Quinn T.C., Stabinski L. High frequency of false-positive hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assay in Rakai, Uganda. *Clin. Infect. Dis.*, 2013, vol. 57, no. 12, pp. 1747–1750. doi: 10.1093/cid/cit602
12. Njouom R., Frost E., Deslandes S., Mamadou-Yaya F., Labbé A.C., Pouillot R., Mbélesso P., Mbadingai S., Rousset D., Pépin J. Predominance of hepatitis C virus genotype 4 infection and rapid transmission between 1935 and 1965 in the Central African Republic. *J. Gen. Virol.*, 2009, vol. 90, no. 10, pp. 2452–2456. doi: 10.1099/vir.0.011981-0
13. Onakewhor J.U., Okonofua F.E. Seroprevalence of Hepatitis C viral antibodies in pregnancy in a tertiary health facility in Nigeria. *Niger. J. Clin. Pract.*, 2009, vol. 12, no. 1, pp. 65–73.
14. Purdy M.A., Forbi J.C., Sue A., Layden J.E., Switzer W.M., Opare-Sem O.K., Phillips R.O., Khudyakov Y.E. A re-evaluation of the origin of hepatitis C virus genotype 2 in West Africa. *J. Gen. Virol.*, 2015, vol. 96, no. 8, pp. 2157–2164. doi: 10.1099/vir.0.000153
15. Ruggieri A., Argentini C., Kouruma F., Chionne P., D’Ugo E., Spada E., Dettori S., Sabbatani S., Rapicetta M. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry). *J. Gen. Virol.*, 1996, vol. 77, pp. 2073–2076. doi: 10.1099/0022-1317-77-9-2073
16. Tagny C.T., Mbanya D., Murphy E.L., Lefrère J.J., Laperche S. Screening for hepatitis C virus infection in a high prevalence country by an antigen/antibody combination assay versus a rapid test. *J. Virol. Methods*, 2014, vol. 199, pp. 119–123. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.01.002
17. World Health Organization. Hepatitis C. *WHO. Fact Sheet, April 2017*.

Авторы:

Калинина О.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Личная Е.В., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Буаро М.И., профессор, директор НИИ прикладной биологии Гвинеи, г. Киндия, Гвинейская Республика;
Тотолян Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kalinina O.V., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Evolution and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Lichnaia E.V., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Boiro M.Y., Professor, General Director, Institute of Applied Biology in Guinea, Kindia, Republic of Guinea;
Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.06.2017
 Принята к печати 30.06.2017

Received 08.06.2017
 Accepted 30.06.2017

СЕПСИС У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Л.В. Пузырева¹, В.Д. Конченко², Л.М. Далабаева²

¹ ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия

² БУЗОО Инфекционная клиническая больница № 1 имени Д.М. Далматова, г. Омск, Россия

Резюме. Септические проявления у пациентов в настоящее время не являются редкостью, особенно в хирургической, педиатрической и акушерской практике. Однако проявлению сепсиса у пациентов с ВИЧ-инфекцией в настоящее время уделено мало внимания, несмотря на эпидемию данного заболевания. Проанализированы клинико-лабораторные проявления сепсиса у 36 пациентов с ВИЧ-инфекцией. Основная группа представлена пациентами с летальным исходом ($n = 18$), контрольная — с положительным исходом стационарного этапа лечения ($n = 18$). Работа проведена по материалам Инфекционной клинической больницы № 1 им. Д.М. Далматова г. Омска. Наиболее часто у ВИЧ-инфицированных пациентов встречалась стадия вторичных заболеваний. Антиретровирусную терапию получали только 33% больных в контрольной группе. У умерших пациентов гипертермия возникла позже развития жалоб со стороны органов и систем и длилась менее 15 дней. Отмечались низкие показатели уровня CD4⁺ лимфоцитов и высокая вирусная нагрузка ВИЧ в крови пациентов с летальным исходом. В общем анализе крови чаще выявлялись тромбоцитопении, эозинопении, моноцитопении, в биохимическом анализе — увеличение общего билирубина, тимоловой пробы, протромбинового индекса, мочевины. При бактериологическом исследовании крови выявлялась различная микрофлора с преобладанием *S. aureus*, иногда в сочетании с грамотрицательной флорой. Признаки инфекционного эндокардита были выявлены у каждого второго умершего ВИЧ-инфицированного пациента. Почти у всех больных выявлялись рентгенологические изменения в легочной ткани. Таким образом, клинические проявления у пациентов с ВИЧ-инфекцией отличаются малосимптомностью и нетипичностью, что требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: сепсис, ВИЧ-инфекция, иммуносупрессия, грамположительный сепсис, грамотрицательный сепсис, тромбоцитопения, инфекционный эндокардит.

SEPSIS AT HIV-POSITIVE PATIENTS

Puzyryova L.V.^a, Konchenko V.D.^b, Dalabayeva L.M.^b

^a Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

^b D.M. Dalmatov Infectious Hospital No. 1, Omsk, Russian Federation

Abstract. Septic implications at patients aren't a rarity, especially in surgical, pediatric and obstetric practice now. However not enough attention, despite epidemic of this disease is paid to implication of a sepsis at patients with HIV infection now. Clinical laboratory implications of a sepsis at 36 patients with HIV infection are analysed. The main group is presented by patients with a lethal outcome ($n = 18$), control — with a positive outcome of a stationary stage of treatment ($n = 18$). Work is carried out on materials of the Infectious hospital No. 1 of D.M. Dalmatov of Omsk. At HIV-positive patients the stage of secondary diseases met most more often. Anti-retrovirus therapy was accepted only by 33% of patients in control group. At the died patients the hyperthermia arose after development of complaints

Адрес для переписки:

Пузырева Лариса Владимировна
644010, Россия, г. Омск, ул. Сергея Лазо, 2,
Омский государственный медицинский университет МЗ РФ.
Тел.: (3812) 53-26-66.
E-mail: puzirevalv@mail.ru

Contacts:

Larisa V. Puzyryova
644010, Russian Federation, Omsk, Sergey Lazo str., 2,
Omsk State Medical University.
Phone: (3812) 53-26-66.
E-mail: puzirevalv@mail.ru

Библиографическое описание:

Пузырева Л.В., Конченко В.Д., Далабаева Л.М. Сепсис у ВИЧ-инфицированных пациентов // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 251–258. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-251-258

Citation:

Puzyryova L.V., Konchenko V.D., Dalabayeva L.M. Sepsis at HIV-positive patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 251–258. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-251-258

© Пузырева Л.В., Конченко В.Д., Далабаева Л.М., 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2017-3-251-258>

from organs and systems and lasted less than 15 days. Low indicators of the CD4⁺ lymphocytes and a high virus load of HIV in a blood of patients with a lethal outcome became perceptible. In the general blood test thrombocytopenias, eosinopenias, monocytopenias, in the biochemical analysis — augmentation of the general bilirubin, thymol turbidity test, prothrombin ratio, urea were more often taped. At a bacteriological blood analysis various microflora with prevalence of *S. aureus*, sometimes in combination with Gram-negative flora was taped. Symptoms of an infectious endocarditis were taped at every second dead of the HIV-positive patient. Almost at all patients radiological changes in a pulmonary tissue were taped. Thus, clinical implications at patients with HIV infection are few symptoms and not typicalness that demands further studying.

Key words: *sepsis, HIV infection, immunosuppression, Gram-positive sepsis, Gram-negative sepsis, thrombocytopenia, infectious endocarditis.*

«Узкие специалисты, традиционно продвигаясь по «своим желобам», как правило, попадают в тупик» (академик Ю.А. Овчинников, 1985). И если это верно вообще, то в сто раз вернее в отношении клиницистов, пытающихся изучить только «свой» сепсис (хирургический, гинекологический, педиатрический и пр.) [15].

По современным представлениям, сепсис является генерализованной, ациклично протекающей формой инфекционного процесса, при котором возбудителю принадлежит ведущая роль в формировании иммуносупрессии в пораженном организме. Сопутствующая бактериемии токсинемия и связанные с ней метаболические нарушения усиливают иммуносупрессию, что, в конечном счете, приводит к развитию синдрома системного воспалительного ответа — ведущего, но не единственного клинического синдрома сепсиса. Предшествующее инфекционному заболеванию употребление наркотических веществ дополнительно угнетает иммунную систему организма и способствует генерализации инфекции. В связи с этим наркоманы представляют группу высокого риска формирования септического процесса [17]. Крайне актуальна эта проблема на фоне роста заболеваемости ВИЧ-инфекцией во многих регионах России. В Омской области заболеваемость ВИЧ-инфекцией составляла в 2015 г. 110,7 на 100 тыс. населения, а на 01.01.17 г. — было зарегистрировано 14 914 больных, доля инфицирования при парентеральном введении наркотических веществ составила 56,7% [6, 12].

У пациентов с ВИЧ-инфекцией частой причиной смерти является развитие гнойно-септических осложнений [10, 12, 15], этиологическим фактором которых могут выступать как условно-патогенная, так и патогенная микрофлора. Тяжесть состояния зависит от снижения уровня CD4⁺ лимфоцитов и определена либо отсутствием, либо отказом от антиретровирусной терапии (АРТ) [16, 18]. Частым проявлением сепсиса у пациентов с ВИЧ-инфекцией являются бактериальные пневмонии [11] и бактериальные эндокардиты [7].

Диагностика и лечение гнойно-септических заболеваний при ВИЧ-инфекции затруднена

в связи с отсутствием стандартов диагностики и лечения данной патологии у ВИЧ-положительных пациентов [8, 17].

Цель исследования проанализировать клинико-лабораторные проявления сепсиса у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы

Ретроспективно проанализированы случаи сепсиса у ВИЧ-инфицированных, находившихся на лечении в БУЗОО «Инфекционная клиническая больница № 1 имени Д.М. Далматова» в период с 2015 по 2016 гг. (n = 36). Основная группа (n = 18) — пациенты с летальным исходом, контрольная (n = 18) — пациенты с положительным исходом стационарного этапа лечения. Анализу подвергнуты все описанные жалобы, клинические данные и лабораторные показатели, проводимые у пациентов в стационаре (более достоверные и специфичные методы, например прокальцитонин и т.д., не проводились в виду их высокой стоимости).

По гендерному признаку достоверных отличий не получено. Все пациенты были безработными, потребителями инъекционных наркотиков, с судимостью в анамнезе у 15 (1 группа) и 14 (2 группа) больных. Средний возраст в основной группе: 32,3±1,1; в контрольной — 33,4±3,2 лет (p > 0,05).

У большинства ВИЧ-инфицированных пациентов с сепсисом на момент поступления в стационар были установлены следующие клинико-патогенетические варианты заболевания, в соответствии с классификацией В.И. Покровского (2001 г.) [9].

Статистическая обработка материала проведена с помощью методов вариационной статистики на основе анализа абсолютных и относительных величин с использованием пакета прикладных программ Statistica 6. Количественные данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение. Для сравнения показателей в группах использовался критерий Стьюдента (t). Статистическая значимость результатов выражалась в виде p = 0,000, результаты считались значимыми при p < 0,05.

Результаты

В стадии первичных проявлений в группе пациентов с летальным исходом было 2 больных (2Б и 2В по одному пациенту), в контрольной группе регистрировался один больной в стадии 2В. Субклиническая стадия ВИЧ-инфекции была выявлена у 5 больных в контрольной группе и одного пациента в основной. Стадии вторичных заболеваний встречались у большинства больных в обеих группах: 4А — 6 и 8; 4Б — 7 и 3; 4В — 3 и 0 больных в основной и контрольной группах соответственно ($p > 0,05$). В группе с положительным исходом стационарного лечения получали АРТ только 33,3% (6) больных (в среднем в течение $29,3 \pm 18,4$ дней), в группе с летальным исходом таких пациентов вообще не было ($p > 0,05$).

В день госпитализации в стационар у всех пациентов наблюдалась слабость и головная боль различной интенсивности. Периодически возникали тошнота (у 3 и 1 больных), рвота центрального генеза (у 2 и 1 пациентов), головокружение (у 4 и 2 больных в основной и контрольной группах соответственно) ($p > 0,05$).

Лихорадка более 40°C и снижение массы тела более чем на 5 кг за месяц чаще регистрировались в группе с неблагоприятным исходом — 77,8% против 11,1% в контрольной группе ($t = 3,45$; $p = 0,002$). При этом, длительность всего лихорадочного периода у пациентов с летальным исходом наблюдалась чаще до 15 дней ($12,3 \pm 4,7$ дней), а в контрольной группе лихорадка сохранялась дольше, чаще от 15 до 32 дней ($25,8 \pm 7,4$ дней) ($t = 3,7$; $p = 0,001$).

В группах исследования у пациентов наблюдались различные жалобы: от кашля и одышки до болей в области сердца, болей в животе без четкой локализации. Иногда пациенты обращались за медицинской помощью в связи с диареей. Сыпь на теле наблюдалась лишь у части больных (табл. 1) ($p > 0,05$). Указанные симптомы более длительное время беспокоили пациентов основной группы (чаще более 3 недель, $24,3 \pm 6,4$ дней). В группе сравнения указанные жалобы наблюдались до 2 недель, $13,2 \pm 2,2$ дней ($t = 2,6$; $p = 0,01$).

При сепсисе часто наблюдается реакция со стороны желудочно-кишечного тракта в виде тошноты, рвоты, поноса, болей в животе, что в данном случае с одной стороны может привести к гипердиагностике перитонита, с другой — к недооценке тяжести состояния пациента, лечению кишечной инфекции, и, соответственно, к потере времени [1].

У части пациентов наблюдалась некоторая неврологическая симптоматика. В группе умерших чаще на момент госпитализации отмечалась неадекватность поведения и явления дезориентации (табл. 2).

Уровень CD4^+ лимфоцитов в крови пациентов с летальным исходом в среднем составлял $143,9 \pm 33,3$ кл/мкл ($t = 2,306$; $p = 0,017$), а вирусная нагрузка $1\ 002\ 266,4 \pm 236\ 904,9$ ($t = 1,782$; $p = 0,046$). В контрольной группе, наоборот, уровень CD4^+ лимфоцитов составлял $296,3 \pm 63,8$ кл/мкл и вирусная нагрузка $475\ 630,8 \pm 131\ 742,3$ копий/мл.

В общем анализе крови у пациентов основной группы уровень моноцитов, эозинофилов

Таблица 1. Жалобы, встречающиеся у больных в группах исследования, абс. (%)

Table 1. The complaints which are found at patients in groups of a research, abs. (%)

Признак Sign	Основная группа (n = 18) Main group (n = 18)	Контрольная группа (n = 18) Control group (n = 18)
Кашель Tussis	4 (22,2)	6 (33,3)
Одышка при нагрузке Dyspnea at a load	5 (27,8)	3 (16,7)
Одышка в покое Dyspnea at rest	1 (5,6)	1 (5,6)
Боль в сердце Heartache	4 (22,2)	6 (33,3)
Боль в животе без четкой локализации Abdominal pain without accurate localization	9 (50,0)	4 (22,2)
Боль в животе слева Abdominal pain at the left	4 (22,2)	2 (11,1)
Неоформленный стул Not properly executed chair	8 (44,4)	6 (33,3)
Сыпь на теле Eruption on a body	6 (33,3)	2 (11,1)

Таблица 2. Неврологическая симптоматика, встречающаяся у больных в группах исследования, абс. (%)
 Table 2. The neurologic symptomatology which is found at patients in groups of a research, abs. (%)

Признак Sign		Основная группа (n = 18) Main group (n = 18)	Контрольная группа (n = 18) Control group (n = 18)
Нарушения сознания Consciousness disturbances	сопор spoor (devoalization)	5 (27,8)	2 (11,1)
	ступор stupor	3 (16,7)	1 (5,6)
	без нарушения without disturbance	10 (55,6)	15 (83,3)
Неадекватность поведения Not adequacy of behavior		13 (72,2)	5 (27,8)
Явления дезориентации Disorientation phenomena		11 (61,1)	7 (38,9)
Ригидность мышц затылка Nape muscle tension		8 (44,4)	5 (27,8)
Глазоболоочный симптом Morbid pressing on eyeballs through the closed eyelids		6 (33,3)	5 (27,8)
Симптом Кернига Kernig's sign		5 (27,8)	3 (16,7)

и тромбоцитов был достоверно ниже. Описанные многими авторами классические изменения в крови при септической инфекции, такие как нейтрофильный лейкоцитоз и сдвиг лейкоцитарной формулы влево, токсическая зернистость нейтрофилов для пациентов с ВИЧ-инфекцией не характерны в связи с выраженным иммунодефицитом. Однако эозинопения и тромбоцитопения часто встречаются у пациентов с генерализованной бактериальной инфекцией независимо от ВИЧ-статуса [1].

В биохимическом анализе крови отмечено увеличение общего билирубина, тимоловой пробы, ПТИ, мочевины. Возможно, рост указанных показателей связан с развитием и нарастанием полиорганной недостаточности [3, 5, 19, 20].

У больных с летальным исходом на момент госпитализации была выявлена тахикардия — $111,8 \pm 5,7$ уд./мин, по сравнению с группой контроля — $87,7 \pm 3,6$ уд./мин ($t = 3,573$; $p = 0,001$). Частота дыхания в основной группе составляла $22,4 \pm 5,4$, в контрольной группе — $19,4 \pm 2,7$ в минуту ($t = 1,347$; $p = 0,098$). Различия в уровнях систолического и диастолического давления в группах исследования статистически не были достоверными: систолическое — $84,0 \pm 21,0$ и $107,7 \pm 22,9$ мм рт.ст. ($t = 0,24$; $p = 0,407$); диастолическое — $62,6 \pm 14,2$ и $70,5 \pm 19,4$ мм рт.ст. ($t = 1,347$; $p = 0,098$).

В посевах крови на микрофлору преимущественно выявлялся золотистый стафилококк. У больных в основной группе чаще встречалась микст-инфекция, что возможно способствовало развитию летального исхода ($t = 2,153$; $p = 0,04$).

Основоположник учения о сепсисе профессор В.Г. Бочоришвили описал грамположительный молниеносный сепсис следующей триадой: резкое повышение температуры до высоких значений, раннее (в первые часы и в первые сутки) развитие острой левожелудочковой (реже правожелудочковой) сердечной недостаточности, страх смерти. Считается, что эта триада является патогномоничной, поэтому при появлении этих признаков необходимо как можно раньше начать соответствующее лечение [15].

При грамтрицательном молниеносном сепсисе на первый план выступает не сердечная, а периферическая сосудистая недостаточность, что проявляется в развитии классического эндотоксического шока. Возникает генерализованный спазм артериол, парез венул, резкое падение перфузии тканей, уменьшение венозного возврата. В терминальной стадии наступает парез прекапилляров, что является необратимой стадией шока. Первоначально спазмирование артериол и прекапилляров ограничивает поступление крови в микроциркуляторное русло, и это первичное расстройство микроциркуляции под влиянием эндотоксина становится причиной всех нарушений гемодинамики [15]. Клинически наблюдаются мраморность кожи, коллаптоидные пятна, принимающие вид трупных, тахикардия, нитевидный, временами исчезающий пульс при сохранении его на крупных сосудах, беспокойное поведение больного, шумное, глубокое дыхание с признаками отека легких. Молниеносный грамотрицательный сепсис отличается чрезвычайно тяжелым течением и высочайшей летальностью.

Таблица 3. Результаты клинического обследования больных в группах исследования

Table 3. Results of clinical trial of patients in groups of a research

Признак Sign	Основная группа (n = 18) Main group (n = 18)	Контрольная группа (n = 18) Control group (n = 18)	t	p
Гемоглобин Hemoglobin	99,1±9,1	11,4±7,0	1,127	0,138
Эритроциты Erythrocytes	3,35±0,3	4,04±0,4	1,369	0,094
Лейкоциты Leucocytes	8,47±1,3	9,24±1,6	0,351	0,364
СОЭ The rate of blood sedimentation	40,5±6,5	35,5±5,0	0,6	0,276
Палочкоядерные лейкоциты Band leucocytes	10,1±2,4	6,5±1,9	1,427	0,086
Сегментоядерные Segmented leucocytes	58,7±5,0	57,0±4,2	0,316	0,378
Лимфоциты Lymphocytes	20,3±3,7	26,1±4,1	1,297	0,106
Моноциты Monocytes	5,1±0,8	8,6±0,9	2,546	0,01
Эозинофилы Eosinocytes	0,5±0,3	1,9±0,6	2,145	0,02
Тромбоциты Thrombocytes	158,0±26,6	241,7±22,7	2,333	0,016
Билирубин общий (норма 8,5–20,5 мкмоль/л) General bilirubin (norm 8,5–20,5 µmol/l)	22,1±8,8	5,7±1,0	1,872	0,039
Тимоловая проба (норма 1–4 ед) Thymol turbidity test (norm 1–4 pieces)	8,5±0,7	5,3±0,7	3,449	0,002
АлАТ (норма до 40 U/L) Alaninaminotransferase (norm to 40 U/L)	84,0±21,0	78,1±17,9	0,24	0,407
АсАТ (норма до 36 U/L) Aspartate aminotransferase (norm to 36 U/L)	102,6±24,2	61,5±19,4	1,347	0,098
ПТИ (норма 80–100%) Prothrombin index (norm 80–100%)	62,6±5,3	88,4±1,5	4,716	0,000
Глюкоза (норма 4,0–6,1 ммоль/л) Glucose (norm 4,0–6,1 mmol/l)	5,7±0,5	5,1±0,3	0,993	0,167
Мочевина (норма 2,5–8,3 ммоль/л) Urea (norm of 2,5–8,3 mmol/l)	9,1±1,5	5,5±0,4	2,063	0,027
Креатинин (норма 44–97 мкмоль/л) Creatinine (norm of 44–97 µmol/l)	135,7±12,9	109,7±5,9	1,7	0,1

Таблица 4. Результат посева крови на верификацию возбудителя, абс. (%)

Table 4. Blood culture result for verifying the pathogen, abs. (%)

Возбудитель Causative agent	Основная группа (n = 18) Main group (n = 18)	Контрольная группа (n = 18) Control group (n = 18)
<i>S. aureus</i>	10 (55,6)	10 (55,6)
<i>S. epidermidis</i>	2 (11,1)	3 (16,7)
<i>E. coli, S. aureus</i>	1 (5,6)	–
<i>S. enteritidis</i>	1 (5,6)	–
<i>E. coli, S. epidermitis</i>	–	1 (5,6)
<i>E. faecalis</i>	–	2 (11,1)
<i>S. warneri</i>	–	1 (5,6)
<i>E. aerogenes</i>	–	1 (5,6)
<i>E. coli, K. pneumoniae, S. aureus*</i>	4 (22,2)	–

Примечание. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Таблица 5. Результат проведения эхокардиографии у больных в группах исследования, абс. (%)

Table 5. Echocardiography results of patients in groups of the research, abs. (%)

Найденные изменения Found changes	Основная группа (n = 18) Main group (n = 18)	Контрольная группа (n = 18) Control group (n = 18)
Недостаточность митрального клапана Mitral valve insufficiency	7 (38,9)	6 (33,3)
Недостаточность трехстворчатого клапана Insufficiency of tricuspid valve	2 (11,1)	7 (38,9)
Недостаточность аортального клапана Aortic valve insufficiency	4 (22,2)	2 (11,1)
Легочная гипертензия Pulmonary hypertension	4 (22,2)	2 (11,1)
Увеличение правых отделов сердца The increase in right heart	4 (22,2)	1 (5,6)
Экссудативный перикардит Pericardial effusion	3 (16,7)	3 (16,7)
Абсцесс створки митрального клапана Abscess of mitral valve	3 (16,7)	0
Признаки инфекционного эндокардита Signs of infective endocarditis	9 (50,0)	4 (22,2)

В основной группе в четырех случаях смешанной септической инфекции (табл. 4) возможно преобладала клиника молниеносного грамотрицательного сепсиса, так как явления эндотоксической интоксикации (головная боль, бессонница, анорексия) наступают раньше и выражены больше чем при остром стафилококковом сепсисе [14].

Септический или бактериальный (инфекционный) эндокардит имеет чрезвычайно важное клиническое значение, так как это самый тяжелый по прогнозу вид сепсиса [2, 4]. Клиническая диагностика на ранних этапах невозможна, относительно патогномичными симптомами считаются только признаки деструкции клапанов сердца и тромбоэмболических осложнений (со стороны головного мозга, селезенки и почек), а эти симптомы всегда поздние. Единственным надежным методом является эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), позволяющее в большинстве случаев выявить наличие вегетаций еще до разрушения клапанов и, таким образом распознать «немые эндокардиты» [15].

При проведении ЭХО-КГ у пациентов с сепсисом во всех случаях были выявлены различные изменения в виде недостаточности клапанов, признаков инфекционного эндокардита, а в некоторых случаях и абсцесса створки митрального клапана (табл. 5).

Чаще всего на рентгенограмме органов грудной клетки были выявлены изменения в виде синдрома ограниченной инфильтрации (22,2 и 33,3%), тотальной и субтотальной инфильтрации (44,4 и 38,9%), фокусной тени (22,2 и 11,1%),

очаговой тени (0,0 и 11,1%), а также синдром патологии плевры (22,2 и 5,6%) и патологии органов средостения (27,8 и 16,7%) в основной и контрольной группах исследования соответственно ($p > 0,05$). Отсутствие какой-либо патологии на рентгенограмме было зарегистрировано у 2 (11,1%) больных в основной и у 1 (5,6%) в контрольной группе.

При анализе сроков пребывания в стационаре было выявлено, что пациенты с летальным исходом в среднем лечились в течение $14,7 \pm 3,7$ койко/дней, выжившие гораздо дольше — $30,8 \pm 1,9$ койко/дней ($t = 2,891$; $p = 0,01$).

Таким образом, у большинства ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдается малосимптомное клиническое течение сепсиса, которое часто сопровождается развитием инфекционного эндокардита. Госпитальная летальность наркозависимых ВИЧ-инфицированных пациентов обусловлена септикопиемией, преимущественно вызванной золотистым стафилококком иногда в сочетании с другими возбудителями. У умерших пациентов жалобы со стороны органов и систем появлялись раньше лихорадки, достоверно чаще наблюдались клинико-лабораторные критерии сепсиса (гипертермия, тахикардия, тромбоцитопения, снижение ПТИ, увеличение мочевины и креатинина). Уровень $CD4^+$ лимфоцитов и вирусная нагрузка влияли на летальный исход ВИЧ-инфицированных больных от сепсиса.

Сепсис, особенно на фоне ВИЧ-инфекции — это особая область медицинских знаний и практики, требующая дальнейшего изучения и совершенствования.

Список литературы/References

1. Абелевич А.И. Хирургический сепсис: современное состояние проблемы // Современные технологии в медицине. 2011. № 2. С. 135–139. [Abelevich A.I. Surgical sepsis: current state of a problem. *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2011, no. 2, pp. 135–139. (In Russ.)]
2. Аитов К.А., Шарифулина Н.Л., Макарова С.В. Анализ смертности у больных ВИЧ-инфекцией в терминальной стадии заболевания // *Medicus*. 2016. № 3 (9). С. 53–55. [Aitov K.A., Sharifulina N.L., Makarova S.V. The analysis of a mortality at patients with HIV infection in a disease end-stage. *Medicus*, 2016, no. 3 (9), pp. 53–55. (In Russ.)]
3. Багин В.А., Назаров А.В., Жданова Т.В., Добрынина О.В. Острое почечное повреждение в структуре полиорганной недостаточности при тяжелом сепсисе // *Инфекции в хирургии*. 2010. Т. 8, № 4. С. 17–19. [Bagin V.A., Nazarov A.V., Zhdanova T.V., Dobrynina O.V. Acute renal damage to structure of a multiorgan failure at a serious sepsis. *Infektsii v khirurgii = Infection in Surgery*, 2010, vol. 8, no. 4, pp. 17–19. (In Russ.)]
4. Виноградова Т.Л. Инфекционный эндокардит: современное течение // *Клиницист*. 2011. № 3. С. 4–10. [Vinogradova T.L. Infectious endocarditis: modern trend. *Klinitsist = Clinician*, 2011, no. 3, pp. 4–10. (In Russ.)]
5. Гамзатов Х.А., Гуржий Д.В. Гемостаз при абдоминальном сепсисе // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2011. Т. 170, № 3. С. 121–123. [Gamzatov H.A., Gurzhy D.V. Hemostasis at an abdominal sepsis. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = I.I. Grekov Herald of Surgery*, 2011, vol. 170, no. 3, pp. 121–123. (In Russ.)]
6. Довгополюк Е.С., Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Мордык А.В., Тюменцев А.Т., Левахина Л.И. Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в Сибирском федеральном округе в 2014 году // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016. № 2. С. 37–41. [Dovgoropolyuk E.S., Puzyreva L.V., Safonov A.D., Mordyk A.V., Tyumentsev A.T., Levakhin L.I. An epidemic situation on HIV infection in Siberian Federal District in 2014. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 2, pp. 37–41. (In Russ.)]
7. Ефремова О.А. Инфекционный эндокардит // *Научные ведомости. Серия «Медицина. Фармация»*. 2010. № 4 (75). Вып. 9. С. 81–94. [Efremova O.A. Infectious endocarditis. *Nauchnye ведомosti. Seriya "Meditsina. Farmatsiya" = Scientific sheets. Medicine series. Pharmaceutics*, 2010, no. 4 (75), iss. 9, pp. 81–94. (In Russ.)]
8. Ильмухина Л.В., Киселева Л.М., Каримов И.Р., Органова М.А., Галявин А.В. Анализ гнойно-септических заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов // *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2011. № 1. С. 30–33. [Ilmukhina L.V., Kiselyova L.M., Karimov I.R., Organova M.A. Galyavin A.V. The analysis of purulent-septic diseases at HIV-positive patients. *Ulyanovskii mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk Medicobiological Journal*, 2011, no. 1, pp. 30–33 (In Russ.)]
9. Покровский В.И., Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД. Клинические рекомендации. М., 2010. 156 с. [Pokrovsky V.I., Pokrovsky V.V. VICH-infektsiya i SPID. Klinicheskie rekomendatsii [HIV infection and AIDS. Clinical references]. Moscow, 2010. 156 p.]
10. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Конченко В.Д., Далабаева Л.М., Васильева О.В., Матвеев Е.В. Анализ причин летального исхода у пациентов с ВИЧ-инфекцией // *Забайкальский медицинский вестник*. 2016. № 2. С. 29–32. [Puzyryova L.V., Safonov A.D., Konchenko V.D., Dalabayeva L.M., Vasilyeva O.V., Matveev E.V. The analysis of the reasons of a lethal outcome at patients with HIV infection. *Zabaikal'skii meditsinskii vestnik = Transbaikalian Medical Herald*, 2016, no. 2, pp. 29–32. (In Russ.)]
11. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Мордык А.В. Заболевания органов дыхания при ВИЧ-инфекции // *Журнал инфектологии*. 2016. Т. 8, № 2. С. 17–25. [Puzyryova L.V., Safonov A.D., Mordyk A.V. Diseases of respiratory organs at HIV infection. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 17–25. (In Russ.)]
12. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Назарова О.И., Антипова Т.В., Фурсевич Л.Н., Зеленев А.В., Мусин М.А., Балабохина М.В., Вербанов А.В. Характеристика летальных исходов при ВИЧ-инфекции в зависимости от гендерной принадлежности пациентов // *Медицинский альманах*. 2016. № 3 (43). С. 96–99. [Puzyryova L.V., Safonov A.D., Nazarova O.I., Antipova T.V., Fursevich L.N., Zelenov A.V., Musin M.A., Balabokhina M.V., Verbanov A.V. The characteristic of lethal outcomes at HIV infection depending on gender accessory of patients. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2016, no. 3 (43), pp. 96–99. (In Russ.)]
13. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Назарова О.И., Антипова Т.В., Фурсевич Л.Н., Зеленев А.В., Мусин М.А., Балабохина М.В., Вербанов А.В. Основные клинические причины летальных исходов у ВИЧ-инфицированных больных в Омской области в 2012–2015 годах // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2016. Т. 8, № 3. С. 59–64. [Puzyryova L.V., Safonov A.D., Nazarova O.I., Antipova T.V., Fursevich L.N., Zelenov A.V., Musin M.A., Balabokhina M.V., Verbanov A.V. The main clinical reasons for lethal outcomes at HIV-positive patients in the Omsk region in 2012–2015 years. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV infection and Immunosuppressions*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 59–64. (In Russ.)]
14. Ребенко Ж.А. Сепсис — инфекционная болезнь в иммунонедостаточном организме // *Инфекционные болезни*. 2004. Т. 2, № 2. С. 82–85. [Rebenoc Zh.A. Sepsis — an infectious disease in an immunoinufficient organism. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 82–85. (In Russ.)]
15. Сепсиология с основами инфекционной патологии. Под ред. В.Г. Бочоришвили. Тбилиси, 1988. 806 с. [Sepsisologiya s osnovami infektsionnoi patologii [Sepsicology with bases of infectious pathology]. Ed. V.G. Bochorishvili. Tbilisi, 1988, 806 p.]
16. Уланова В.И., Мазуров В.И. Инфекционный эндокардит у лиц с наркотической зависимостью: клинико-морфологические особенности и результаты консервативной терапии // *Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования*. 2010. Т. 2, № 4. С. 43–47. [Ulanova V.I., Mazurov V.I. An infectious endocarditis at persons with drug addiction: clinical and morphological features and results of conservative therapy. *Vestnik Sankt-Peterburgskoi meditsinskoi akademii poslediplomnogo obrazovaniya = Herald of St. Petersburg Medical Academy of Post-Graduate Education*, 2010, vol. 2, no. 4, pp. 43–47. (In Russ.)]
17. Уланова В.И., Мазуров В.И. Особенности клинического течения и анализ выживаемости ВИЧ-инфицированных наркозависимых больных инфекционным эндокардитом // *Вестник Российской военно-медицинской академии*.

2010. № 3 (31). С. 103–107. [Ulanova V.I., Mazurov V.I. Features of a clinical current and analysis of survival of HIV-positive drug-addicted patients with an infectious endocarditis. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii = Herald of Russian Military Medical Academy*, 2010, no. 3 (31), pp. 103–107. (In Russ.)]
18. Филиппенко П.С., Шутко И.С. Оценка степени интоксикации при деструктивной пневмонии и остром абсцессе легкого // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2010. № 4. С. 14–16. [Filippenko P.S., Shutko I.S. Intoxication degree assessment at destructive pneumonia and acute abscess of a lung. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Herald of the North Caucasus*, 2010, no. 4, pp. 14–16. (In Russ.)]
19. Carlet J. Prescribing indications based on successful clinical trials in sepsis: a difficult exercise. *Crit. Care Med.*, 2006, vol. 34, pp. 525–529.
20. Toussaint S., Gerlach H. Activated protein C for sepsis. *N. Engl. J. Med.*, 2009, vol. 361, pp. 2646–2652.

Авторы:

Пузырева Л.В., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней Омского государственного медицинского университета, г. Омск, Россия;
Конченко В.Д., зав. отделением для лечения больных с ВИЧ-инфекцией БУЗОО Инфекционная клиническая больница № 1 им. Д.М. Далматова, г. Омск, Россия;
Далабаева Л.М., врач-инфекционист отделения для лечения больных с ВИЧ-инфекцией БУЗОО Инфекционная клиническая больница № 1 им. Д.М. Далматова, г. Омск, Россия.

Authors:

Puzyryova L.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Konchenko V.D., Head of the HIV-infection Patients Treatment Unit, D.M. Dalmatov Infectious Hospital No. 1, Omsk, Russian Federation;
Dalabayeva L.M., Infectiologist, HIV-infection Patients Treatment Unit, D.M. Dalmatov Infectious Hospital No. 1, Omsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.05.2017
Принята к печати 05.06.2017

Received 11.05.2017
Accepted 05.06.2017

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕНОТИПА И МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА

А.А. Савченко^{1,2}, А.Г. Борисов^{1,2}, И.В. Кудрявцев^{3,4,5}, И.И. Гвоздев¹, А.В. Мошев¹, Д.В. Черданцев², О.В. Первова²

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

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

Резюме. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи фенотипа и метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) в динамике послеоперационного периода. Обследовано 27 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП. Взятие крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 24 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 67 относительно здоровых людей. Исследование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. По средней интенсивности флуоресценции оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови исследовали с помощью биолюминесцентного метода. Обнаружено, что у больных РГП уже в дооперационном периоде в периферической крови повышено содержание CD62L⁺, HLA-DR⁺ и CD64⁺-нейтрофилов. Высокий уровень содержания CD62L⁺-клеток сохраняется в течение 24 суток послеоперационного периода, тогда как количество HLA-DR⁺ и CD64⁺-нейтрофилов на 24 сутки послеоперационного периода снижается до уровня нормы. Динамике изменения содержания CD64⁺-клеток в периферической крови больных РГП соответствует уровень экспрессии CD64-рецептора на мембране нейтрофильных гранулоцитов. Метаболизм нейтрофилов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде характеризуется высокой интенсивностью субстратного потока по циклу трикарбонных кислот, низкой активностью НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы и аэробной реакции лактатдегидрогеназы. В дооперационном периоде и в течение 14 дней послеоперационного периода в нейтрофильных гранулоцитах больных выявляется высокая активность анаэробной реакции лактатдегидрогеназы, характеризую-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

Igor V. Kudryavtsev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Библиографическое описание:

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 259–270. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-259-270

© Савченко А.А. и соавт., 2017

Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V., Cherdancev D.V., Pervova O.V. The phenotype and metabolism relationship of blood neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis in the postoperative period dynamics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 259–270. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-259-270

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2017-3-259-270>

шая повышенную активность анаэробного гликолиза. В конце послеоперационного периода интенсивность анаэробной энергетики в нейтрофилах больных РГП снижается до контрольного уровня. Завершающий этап послеоперационного лечения со стороны метаболизма нейтрофилов крови больных РГП также характеризуется активацией пентозофосфатного цикла, низкой активностью малат-аспартатного шунта митохондрий и высокой интенсивностью субстратного взаимодействия между лимонным циклом и реакциями аминокислотного обмена. С помощью корреляционного анализа установлена дизрегуляция между фенотипом и системой внутриклеточного метаболизма нейтрофилов, которая может определяться миграцией активированных клеток в очаг воспаления, а также изменением активности внутриклеточных ферментов под воздействием различных регуляторных факторов и, в том числе, методов послеоперационной терапии перитонита.

Ключевые слова: перитонит, послеоперационный период, нейтрофильные гранулоциты, фенотип, метаболизм, активность ферментов.

THE PHENOTYPE AND METABOLISM RELATIONSHIP OF BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS IN THE POSTOPERATIVE PERIOD DYNAMICS

Savchenko A.A.^{a,b}, Borisov A.G.^{a,b}, Kudryavcev I.V.^{c,d,e}, Gvozdev I.I.^a, Moshev A.V.^a, Cherdancev D.V.^b, Pervova O.V.^b

^a Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to examine the relationship of the phenotype and metabolism of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis (WPP) in the dynamics of the postoperative period. The study involved 27 patients with acute surgical diseases and injuries of abdominal organs complicated by WPP. Blood sampling was performed prior to surgery (pre-operative period) and at 7, 14 and 24 day post-operative period. As controls 67 respect healthy people were examined. Research blood neutrophilic granulocytes phenotype was performed by flow cytometry using a direct immunofluorescence whole peripheral blood. The levels of surface receptor expression was assessed by the mean fluorescence intensity. The NAD- and NADP-dependent dehydrogenases activity in the blood neutrophils studied using bioluminescence method. It was found that in patients with WPP in the preoperative period in the peripheral blood increased content of CD62L⁺, HLA-DR⁺ and CD64⁺-neutrophils. High levels of CD62L⁺-cells stored within 24 postoperative days, whereas the amount of HLA-DR⁺ and CD64⁺-neutrophils on 24 postoperative day is reduced to the level of controls. The dynamics of changes in the content of CD64⁺-cells in the peripheral blood of patients with WPP corresponds to the expression level of CD64-receptor on the membrane of neutrophilic granulocytes. The metabolism of blood neutrophils in patients with WPP in the pre- and postoperative period is characterized by high intensity of the substrate stream on the citric acid cycle, low activity of NADP-dependent glutamate dehydrogenase and aerobic reaction of lactate dehydrogenase. In the preoperative period and within 14 days of the postoperative period in neutrophil granulocytes of the patients revealed high activity of anaerobic lactate dehydrogenase reaction characterized by increased activity of anaerobic glycolysis. In the late postoperative period the intensity of anaerobic energy in the neutrophils of patients with WPP was reduced to the control level. The final stage of post-operative treatment the metabolism in the blood neutrophils of patients with WPP is also characterized by the activation of the pentose phosphate cycle, low activity of malate-aspartate shunt mitochondria and high intensity of the substrate interaction between citric acid cycle and reactions of amino acid metabolism. Using correlation analysis set dysregulation between phenotype and the system of intracellular metabolism of neutrophils which can be determined by the migration of activated cells in the inflammatory focus as well as changes in the activity of intracellular enzymes under different regulatory factors and including postoperative therapy methods peritonitis.

Key words: peritonitis, post-operative period, neutrophil granulocytes, phenotype, metabolism, enzyme activity.

Введение

Активное участие системы иммунитета во многих жизненно важных процессах организма приводит к тому, что нарушения иммунореактивности обуславливают широкое как функциональное, так и структурное (патоморфологическое) многообразие проявлений патологий человека [4, 5]. Показано, что распростра-

ненный гнойный перитонит (РГП) протекает на фоне иммунодефицита, а в терминальной стадии (полиорганной недостаточности) иммунная недостаточность наиболее выражена [4, 18]. Предполагается, что нарушения в иммунной системе имеют решающее значение для возникновения различных осложнений заболевания.

Характер течения инфекционно-воспалительного процесса в брюшной полости при

РГП во многом определяются функциональной активностью нейтрофильных гранулоцитов. Нейтрофилы представляют собой высокореактивный тип клеток иммунной системы, они быстро мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [4, 5, 18]. Доказано, что нейтрофильные гранулоциты являются не только эффекторными (фагоцитирующими) клетками, но и регуляторными, так как синтезируют широкий спектр цитокинов, которые также включаются в регуляторный комплекс иммуновоспалительных реакций [4, 14, 27].

Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов зависит от уровня экспрессии различных рецепторов [8, 11, 20]. Так, миграция клеток из кровеносного русла в опухоль определяется экспрессией адгезионных молекул [8, 13, 17]. Экспрессия рецепторов для Fc-фрагмента иммуноглобулинов на поверхности нейтрофилов формирует пул армированных фагоцитов, участвующих в процессе антителозависимой цитотоксичности [10, 11, 26]. Учитывая, что все регуляторные и антигенные молекулы реализуют свое воздействие на клетку через рецепторы, влияя на экспрессию генов, модулируя энергетические и пластические реакции, функциональные проявления нейтрофилов не могут не иметь метаболической основы [3, 12, 23]. РГП сопровождается избыточным поступлением в биологические среды организма микробных антигенов и бактериальных токсинов, источниками которых являются гнойно-деструктивные очаги в брюшной полости, перитонеальный экссудат и паралитически измененные петли кишечника [4, 18]. В связи с этим, активность внутриклеточных ферментов в нейтрофилах будет с одной стороны определять уровень их реактивности, с другой стороны, — модулироваться нарушениями гомеостаза, развивающимися при инфекционно-воспалительном процессе.

Таким образом, целью исследования явилось изучение взаимосвязи фенотипа и метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода.

В качестве показателей внутриклеточного метаболизма выбраны НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы в связи с тем, что, во-первых, основными переносчиками электронов в клетках являются пиридиновые нуклеотиды, а отсюда — активное участие оксидоредуктаз в биоэнергетических процессах; во-вторых, НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, участвуя в направленной координации сопряженных метаболических потоков, в значительной степени обуславливают адаптивные изменения клеточного обмена веществ [1, 3, 24].

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» обследовано 27 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–65 лет. Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез. Объем оперативного вмешательства и количество санаций определялись лечащим врачом в зависимости от состояния больного. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 24 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 67 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченых FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7): CD11b, CD62L, CD16, CD23, CD64 и HLA-DR. По средней интенсивности флуоресценции (MFI — Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [16]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 нейтрофилов.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ — для отделения лимфоцитов, $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ — для выделения нейтрофилов. Для проведения биолюминесцентного анализа активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой

Таблица 1. Фенотип нейтрофильных гранулоцитов у больных РПП в динамике послеоперационного периода (Me, C₂₅-C₇₅)
 Table 1. The phenotype of neutrophilic granulocytes in patients with WPP in the dynamics of the postoperative period (Median values, C₂₅-C₇₅)

Показатели Parameters	Контроль, n = 67 Control		Дооперационный период, n = 27 Preoperative period		7 сутки после операции, n = 25 7 days after surgery		14 сутки после операции, n = 21 14 days after surgery		24 сутки после операции, n = 21 24 days after surgery	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Нейтрофилы Neutrophils, 10 ⁹ /л	3,13	2,55-3,86	7,76	5,32-10,26	5,35	3,86-10,23	4,48	3,30-6,45	5,16	3,05-6,62
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,001		p ₁ = 0,022; p ₂ = 0,043	
CD62L⁺, %	5,2	2,5-7,5	6,2	4,2-8,5	5,6	3,8-6,9	6,7	3,5-8,1	7,0	4,8-8,9
	0,17	0,06-0,23	0,49	0,28-0,69	0,30	0,28-0,48	0,24	0,20-0,38	0,30	0,27-0,33
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,014; p ₂ = 0,034		p ₁ = 0,015; p ₂ = 0,041	
CD23⁺, %	6,3	4,9-7,7	5,7	2,2-7,5	6,1	1,5-8,7	5,3	3,1-5,6	5,3	5,2-5,8
							p ₂ = 0,043; p ₃ = 0,043		p ₂ = 0,048	
CD23⁺, 10⁹/L	0,18	0,13-0,22	0,34	0,15-0,58	0,32	0,16-0,62	0,21	0,14-0,26	0,18	0,12-0,28
							p ₂ = 0,028; p ₃ = 0,043		p ₂ = 0,043; p ₃ = 0,044	
HLA-DR⁺, %	98,3	94,3-99,2	73,4	42,4-96,4	90,7	60,0-96,7	94,9	75,0-97,3	96,1	95,3-96,6
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,005; p ₃ = 0,023			
HLA-DR⁺, 10⁹/L	2,77	2,02-3,48	4,95	1,64-7,55	4,25	2,28-7,52	3,27	1,78-4,25	5,01	2,92-5,36
							p ₂ = 0,034; p ₃ = 0,012			
CD64⁺, %	14,8	5,5-62,1	69,7	27,1-90,0	64,2	23,1-90,5	25,8	13,9-71,3	18,7	7,9-40,5
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,034		p ₂ = 0,023; p ₃ = 0,028	
CD64⁺, 10⁹/L	0,41	0,14-2,03	1,72	1,47-3,71	1,74	1,12-3,32	1,02	0,40-3,41	0,45	0,11-2,33
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,048		p ₂ = 0,018; p ₃ = 0,033	
MFI HLA-DR⁺, o.e. relative units	1,70	1,53-1,86	1,48	1,32-1,91	1,65	1,41-2,48	1,75	1,39-3,92	1,38	1,02-1,88
							p ₂ = 0,023		p ₃ = 0,045	
MFI CD64⁺, o.e. relative units	2,23	1,62-3,45	11,50	6,41-31,30	5,02	3,15-16,70	5,07	3,95-7,29	2,69	1,48-3,55
			p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,001		p ₁ = 0,004		p ₂ < 0,001	

Примечание: статистически значимые различия: p₁ — с показателями контрольной группы; p₂ — с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде; p₃ — с показателями на 7 сутки после операции; p₄ — с показателями на 14 сутки после операции.
 Note: p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients with WPP; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients with WPP.

реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР) нейтрофилы разрушали путем осмотического лизиса с добавлением 2 мМ дитиотреитола [3]. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 [1]. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P): FMNоксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, Красноярск).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Достоверность различий между показателями зависимых выборок (сравнение в динамике лечения) оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

Системная воспалительная реакция у больных РГП уже в дооперационном периоде проявляется значительным увеличением (в 2,5 раза) абсолютного количества нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови (табл. 1). В послеоперационном периоде наблюдается тенденция к снижению абсолютного уровня нейтрофилов, но на 24 сутки обследование сохраняется повышенное количество клеток относительно контрольных значений. В дооперационном периоде у больных в 2,9 раза относительно контрольного уровня повышается абсолютное содержание CD62L⁺-нейтрофилов, в послеоперационном периоде также наблюдается тенденция к снижению их количества, но при сохранении высоких значений на 24 сут-

ки лечения. Процентное и абсолютное количество CD23⁺-нейтрофилов в крови у больных РГП в дооперационном периоде соответствует контрольным значениям. Однако на 14 сутки послеоперационного периода наблюдается снижение содержания клеток с экспрессией CD23-рецептора относительно исходного уровня, которое сохраняется и на 24 сутки обследования. Уже на уровне дооперационного периода у больных РГП по сравнению с контрольным диапазоном снижается относительное количество HLA-DR⁺-нейтрофилов. Пониженное процентное и абсолютное содержание клеток, экспрессирующих HLA-DR-маркер, сохраняется на 7 и 14 сутках послеоперационного периода, после чего повышается до контрольного уровня. При этом средняя интенсивность флуоресценции данного маркера на нейтрофилах у пациентов с РГП на всем протяжении обследования соответствовала контрольному диапазону с незначительной динамикой относительно исходного уровня на 14 и 24 сутки послеоперационного периода. Более чем в 4 раза относительно контрольных значений у больных РГП в дооперационном периоде повышается относительное и абсолютное количество CD64⁺-нейтрофилов. На 7 и 14 сутки после операции повышенное количество CD64⁺-нейтрофилов сохраняется, но на 24 сутки послеоперационного периода — снижается до контрольного диапазона. Подобная же динамика сохраняется и для средней интенсивности флуоресценции CD64: в дооперационном периоде MFI CD64 превышает контрольный диапазон в 5,2 раза, сохраняется на повышенном уровне на 7 и 14 сутки после операции, но 24 сутки послеоперационного периода понижается до контрольных значений.

При исследовании активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови обнаружено, что активность Г6ФДГ значительно повышается относительно контрольных значений в клетках больных РГП на 14 сутки после операции и остается повышенной на 24 сутки послеоперационного периода (табл. 2). В то же время, активность НАДФГДГ понижена у обследованных пациентов с РГП уже в дооперационном периоде и сохраняется на низком уровне весь период обследования. Внутриклеточная активность остальных НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде соответствует контрольному диапазону.

При исследовании активности НАД-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови обнаружено, что внутриклеточная активность Г3ФДГ у больных РГП относительно контрольного уровня повышена в дооперационном периоде (табл. 3). После операции активность фермента повышается до контрольных значений.

Таблица 2. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) нейтрофилов у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Me, C₂₅-C₇₅)
 Table 2. The activity of NADP-dependent dehydrogenases (mkU) in the neutrophils by patients with WPP in the dynamics of the postoperative period (Median values, C₂₅-C₇₅)

Показатели Parameters	Контроль, n = 67 Control		Дооперационный период, n = 27 Preoperative period		7 сутки после операции, n = 25 7 days after surgery		14 сутки после операции, n = 21 14 days after surgery		24 сутки после операции, n = 21 24 days after surgery	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
Г6ФДГ Glu6PDH	0,89	0,01-4,18	0,62	0,05-66,24	0,33	0,07-3,39	11,97	1,95-30,48	5,31	0,99-21,06
НАДФМДГ NADP-MDH	0,03	0,01-0,86	0,02	0,01-0,78	0,02	0,01-0,85	0,02	0,01-0,69	0,02	0,01-0,78
НАДФГДГ NADP-GluDH	0,16	0,01-2,31	0,02	0,01-0,46	0,02	0,01-0,14	0,02	0,01-0,12	0,02	0,01-0,23
НАДФИЦДГ NADP-ICDH	1,35	0,05-5,88	0,83	0,18-3,25	0,88	0,16-3,31	0,83	0,09-2,93	0,38	0,08-1,62
ГР/GR	1,14	0,11-6,68	0,17	0,05-15,46	4,67	0,23-15,56	17,49	0,33-15,47	1,12	0,15-14,48
НАДФН-ГДГ NADPH-GluDH	12,48	4,42-31,40	16,26	8,11-40,40	4,43	0,41-15,04	35,10	9,49-60,22	23,23	12,97-48,92

Примечание: то же, что и для табл. 1.
 Note: the same as for Table 1.

В дооперационном и на всем протяжении послеоперационного периода в нейтрофилах крови больных РГП относительно контрольного уровня снижена активность ЛДГ. Активность МДГ и НАДИЦДГ в клетках обследованных пациентов с РГП повышена относительно контрольных значений в до- и послеоперационном периоде. Активность НАДФГДГ в нейтрофилах крови больных РГП понижена в дооперационном периоде, повышается до контрольного уровня на 7 сутки после операции и затем значительно возрастает относительно исходных значений и контрольного диапазона на 24 сутки послеоперационного периода. Активность НАДН-ЛДГ в нейтрофилах пациентов с РГП повышена относительно контрольного диапазона в дооперационном периоде и на 7 и 14 сутки после операции, но резко снижается (по сравнению с контрольными и исходными значениями) на 24 сутки послеоперационного периода. На 24 сутки послеоперационного периода активность НАДН-МДГ в нейтрофилах больных РГП снижается, как относительно контрольного уровня, так и значений, которые выявлены в предыдущие периоды обследования у пациентов с РГП. Кроме того, обнаружено, что активность НАДН-ГДГ в клетках обследованных больных повышена на 14 и 24 сутки послеоперационного периода относительно контрольных значений.

С помощью корреляционного анализа установлено, что у лиц контрольной группы относительное количество HLA-DR⁺-нейтрофилов положительно взаимосвязано с активностью ГР ($r = 0,88, p = 0,008$). Также у лиц контрольной группы обнаружены положительные корреляции средней интенсивности флуоресценции HLA-DR с НАДФМДГ ($r = 0,79, p = 0,033$), а CD64 с ГР ($r = 0,85, p = 0,016$).

У больных РГП в дооперационном периоде активность МДГ положительно взаимосвязана с относительным и абсолютным количеством HLA-DR⁺-нейтрофилов ($r = 0,63, p = 0,021$ и $r = 0,79, p = 0,001$ соответственно). Также выявляется положительная взаимосвязь между активностью ГР и процентным уровнем HLA-DR⁺-нейтрофилов ($r = 0,56, p = 0,046$).

На 7 сутки послеоперационного периода у больных РГП относительное количество CD62L⁺ нейтрофилов положительно взаимосвязано с активностью НАДФГДГ ($r = 0,59, p = 0,041$) и отрицательно — с активностью НАДФН-ГДГ ($r = -0,61, p = 0,034$). У пациентов на данный период обследования процентный уровень CD64⁺ клеток отрицательно коррелирует с активностью НАДИЦДГ ($r = -0,90, p = 0,037$), тогда как средняя интенсивность флуоресценции положительно взаимосвязана с активностью Г6ФДГ ($r = 0,90, p = 0,037$), НАДФМДГ ($r = 0,97, p = 0,005$), НАДФГДГ ($r = 0,89, p = 0,041$) и МДГ ($r = 0,90, p = 0,037$).

Таблица 3. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) нейтрофилов у больных РПП в динамике послеоперационного периода (Me, C₂₅-C₇₅)
Table 3. The activity of NAD-dependent dehydrogenases (mku) in the neutrophils by patients with WPP in the dynamics of the postoperative period (Median values, C₂₅-C₇₅)

Показатели Parameters	Контроль, n = 67 Control		Дооперационный период, n = 27 Preoperative period		7 сутки после операции, n = 25 7 days after surgery		14 сутки после операции, n = 21 14 days after surgery		24 сутки после операции, n = 21 24 days after surgery	
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅
ГЗФДГ Gly3PDH	0,32	0,01-1,72	0,01	0,005-0,17	0,49	0,01-1,79	0,17	0,01-0,78	0,50	0,02-0,94
ЛДГ LDH	10,90	0,89-50,65	1,49	0,55-8,10	0,74	0,08-2,33	1,01	0,18-5,97	0,71	0,49-2,04
МДГ MDH	1,95	0,22-10,80	25,77	10,54-93,20	85,76	4,04-121,51	63,84	7,49-100,11	91,35	45,93-161,81
НАДГДГ NAD-GluDH	0,67	0,01-2,60	0,05	0,01-0,61	0,20	0,10-5,00	0,12	0,08-1,80	14,29	3,87-26,03
НАДИЦДГ NAD-ICDH	0,02	0,01-0,65	2,78	1,41-6,49	6,86	1,26-10,95	6,92	3,12-11,50	10,69	2,66-22,17
НАДН-ЛДГ NADH-LDH	2,39	0,12-18,88	13,81	7,54-36,27	16,38	2,91-47,04	12,26	1,11-23,10	0,28	0,01-2,88
НАДН-МДГ NADH-MDH	15,80	3,67-55,78	22,01	9,94-37,79	33,99	5,73-56,42	12,20	2,00-28,31	0,08	0,01-4,15
НАДН-ГДГ NADH-GluDH	5,98	0,02-16,39	7,95	4,44-12,37	9,88	8,23-25,90	15,93	12,16-29,49	14,19	9,25-59,02

Примечание: то же, что и для табл. 1.
Note: the same as for Table 1.

На 14 и 24 сутки послеоперационного периода у больных РГП корреляционных взаимосвязей между фенотипом нейтрофилов крови и внутриклеточной ферментов не обнаружено.

Обсуждение

Воспалительная реакция у больных РГП характеризуется увеличением содержания нейтрофилов в периферической крови уже в дооперационном периоде и наличием тенденции к снижению (но при сохранении на повышенном уровне) количество гранулоцитов к концу наблюдаемого периода (24 сутки). Функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов в значительной степени определяются их фенотипом. Обнаружено, что в до- и послеоперационном периоде у больных РГП повышено абсолютное количество нейтрофилов, экспрессирующих CD62L-маркер. Молекула CD62L является мембранным гликопротеином, принадлежащий к семейству L-селектинов, который экспрессируется на широком спектре клеток иммунной системы [5, 13]. Рецептор обеспечивает слабые межклеточные взаимодействия, благодаря которым движение нейтрофильных гранулоцитов в кровотоке замедляется и происходит их экстравазация [8, 17]. При этом необходимо отметить, что повышение CD62L⁺-нейтрофилов связано с общим нейтрофилезом у обследованных пациентов. Иммуновоспалительные реакции РГП определяют не только выброс повышенного количества нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга, но их активацию и ускоренную миграцию из сосудистого русла.

С 14 суток послеоперационного периода у больных РГП наблюдается относительное понижение в периферической крови содержания CD23⁺-нейтрофилов (по сравнению с исходным уровнем и выявленным на 7 сутки послеоперационного периода). Гликопротеин CD23 является низкоаффинным рецептором IgE [14, 25]. На нейтрофилах данный маркер экспрессируется под воздействием интерлейкина-4 и характеризует функциональную активацию клеток [14, 27]. Ранее нами было показано, что у больных РГП повышается содержание Th2-клеток, что связано с реакцией иммунной системы на бактериальную инфекцию [4]. По-видимому, в результате проведенной операции и последующего лечения у больных снижается активность Th2-зависимых реакций, что, соответственно, и приводит к относительному снижению количества CD23⁺-нейтрофилов в крови.

У больных РГП в дооперационном периоде снижается относительное количество HLA-DR⁺-нейтрофилов, которое к концу наблюдаемого периода восстанавливается до контрольных значений. В то же время, абсолютное

количество HLA-DR⁺-клеток на 7 и 14 сутки послеоперационного периода повышены, что связано с высоким уровнем общих нейтрофилов в периферической крови. Кроме того, на 14 сутки послеоперационного периода у больных РГП значительно возрастает уровень экспрессии HLA-DR (средний уровень флуоресценции) на поверхности нейтрофилов относительно значений, выявленных в дооперационном периоде. HLA-DR-рецептор является продуктом главного комплекса гистосовместимости II класса, принимает участие в презентации антигенов [5]. Высокий уровень HLA-DR⁺-нейтрофилов и повышенную экспрессию данного маркера, прежде всего, связывают с бактериемией и внеклеточным ацидозом, которые развиваются при различных воспалительных процессах [19, 26, 28]. Соответственно, в результате проведенного лечения интенсивность воспалительных процессов снижается, что на 24 сутки послеоперационного периода приводит к снижению содержания HLA-DR⁺-нейтрофилов в периферической крови и экспрессии активационного маркера.

Содержание CD64⁺-нейтрофилов в крови больных РГП в до- и послеоперационном периоде изменяется аналогично уровню HLA-DR⁺-клеток: в дооперационном периоде значительное превышение контрольных значений, к концу наблюдаемого периода лечения — нормализация. Экспрессия CD64-антигена также повышена в дооперационном периоде и на 24 сутки наблюдения снижается до контрольных значений. CD64 (FcγRI) — является высокоаффинным рецептором к Fc-фрагментам иммуноглобулинов G, является биомаркером бактериальных инфекций [10, 11, 20]. Фагоцитирующие клетки при экспрессии данного рецептора могут удерживать на своей поверхности большое число молекул антител одной специфичности, что обеспечивает специфическое распознавание патогена клетками.

Исследуемые ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы и тем самым, определяя функциональные возможности нейтрофилов. Так, Г6ФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит широкий спектр реакций макромолекулярного синтеза и, как следствие этого, значимость фермента в проявлении функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов [1, 7, 29]. Активность фермента повышается в нейтрофилах крови больных РГП на завершающем этапе лечения (14 и 24 сутки послеоперационного периода), тем самым характеризуя высокую реактивность фагоцитирующих клеток.

Нейтрофилы являются клетками с небольшим количеством митохондрий [21]. В связи с этим, большинство энергозависимых про-

цессов реализуется за счет аденозинтрифосфата (АТФ), нарабатанного в гликолизе [4]. Доказано, что при стимуляции функциональной активности нейтрофилов с помощью липополисахаридов бактериального происхождения наблюдается транслокация переносчиков глюкозы на мембрану клеток с последующим повышением интенсивности анаэробного гликолиза [21, 23]. Блокирование транспорта глюкозы в клетку приводило к ингибированию функциональной активности нейтрофилов. В связи с этим, повышение активности анаэробной реакции ЛДГ (терминальной реакции гликолиза) в нейтрофильных гранулоцитах больных РГП в дооперационном периоде и до 14 суток послеоперационного периода определяет высокий уровень анаэробных энергетических процессов и, соответственно, функциональные возможности клеток. К концу периода наблюдения активности фермента снижается, что, по-видимому, связано со снижением интенсивности воспалительных процессов и реактивности фагоцитирующих клеток. Необходимо отметить, что активность аэробной реакции ЛДГ в нейтрофилах больных РГП снижено как в до-, так и послеоперационном периоде. Подобное состояние может определяться реакцией ингибирования аэробной ЛДГ пируватом, который нарабатывается в анаэробном гликолизе. Активность анаэробной энергетики также могут стимулировать продукты липидного катаболизма, которые через ГЗФДГ переносятся на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [1, 22]. Активность данного фермента в нейтрофилах крови очень низка в дооперационном периоде, в послеоперационном — восстанавливается.

Цикл трикарбоновых кислот, локализующийся в митохондриях, по сути, выполняет роль амфиболического процесса, объединяя все основные внутриклеточные пути обмена [6, 15]. Мы исследовали уровни активности двух ферментов цикла трикарбоновых кислот — МДГ и НАДИЦДГ. Обнаружено, что активность обоих ферментов в нейтрофилах крови больных РГП повышена, как в до-, так и послеоперационном периоде. Подобное состояние двух оксидоредуктаз цикла Кребса характеризует субстратный поток высокой интенсивности, что положительно повлияет на активность аэробного дыхания. Необходимо отметить, аэробное дыхание вносит незначительный вклад в общую энергетику нейтрофильных гранулоцитов, однако высокая активность дыхательной цепи может стимулировать входение клетки в апоптоз [12, 21]. На 24 сутки послеоперационного периода у больных РГП в нейтрофилах крови наблюдается значительное снижение активности НАДН-зависимой реакции МДГ. Данная реакция является ключевой в системе малат-аспаратного

шунта митохондрий [1]. Снижение активности НАДН-МДГ характеризует понижение водородного градиента в митохондриях и, соответственно, ингибировании уровня аэробного дыхания.

Цикл трикарбоновых кислот тесно взаимодействует с реакциями аминокислотного обмена. Глутаматдегидрогеназы, осуществляя данную взаимосвязь, также являются ключевыми ферментами в реакциях азотного обмена [1, 24]. Обнаружено, что в нейтрофилах больных РГП в течение всего наблюдаемого периода снижена активность НАДФГДГ, в дооперационном периоде понижена активность НАДГДГ с последующим повышением к 24 суткам послеоперационного периода, а также выявляется повышение активности НАДН-ГДГ на 14 и 24 сутках послеоперационного периода. Подобное состояние активности исследуемых глутаматдегидрогеназ характеризует ингибирование субстратного взаимодействия между цитратным циклом и реакциями аминокислотного обмена в начальном периоде лечения и активацию — в конце послеоперационного лечения.

С помощью корреляционного анализа установлены взаимосвязи между фенотипическим составом нейтрофилов и активностью НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Так, у здоровых людей обнаружена положительная взаимосвязь между относительным количеством HLA-DR⁺-нейтрофилов и активностью ГР, причем внутриклеточная активность ГР также положительно коррелирует с MFI CD64, а MFI HLA-DR — с активностью НАМФМДГ. Малик-фермент (НАДФМДГ) определяется как ключевой в системе липидного анаболизма [1]. ГР является ферментом глутатион-зависимой антиоксидантной системы [9]. Восстановление глутатиона осуществляется за счет НАДФН, который нарабатывается с помощью НАДФМДГ и в пентозофосфатном цикле. Таким образом, уровень экспрессии активационных маркеров на мембране нейтрофилов и изменение количества клеток в крови, экспрессирующих данные маркеры, взаимосвязано с интенсивностью внутриклеточных перекисных процессов и анаболизма липидов.

У больных РГП в дооперационном периоде количество HLA-DR⁺-нейтрофилов положительно взаимосвязано с активностью МДГ и ГР, что позволяет заключить зависимость содержания активированных нейтрофильных гранулоцитов от интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот и уровня глутатион-зависимой антиоксидантной системы. На 7 сутки послеоперационного периода процентное количество CD62L⁺-нейтрофилов находится в прямой зависимости с внутриклеточной активностью НАДГДГ и в обратной — с НАДФН-ГДГ, тогда как уровень экспрессии HLA-DR зависит от активности Г6ФДГ, малик-фермента, НАДФГДГ и МДГ.

Можно заключить, что на ранней стадии послеоперационного периода метаболический механизм, определяющий миграционную активность нейтрофильных гранулоцитов, определяется направленностью субстратного потока и обмена азота в реакциях, связывающих цикл трикарбоновых кислот и аминокислотный обмен. В то же время, уровень экспрессии CD64-рецептора на мембране нейтрофилов напрямую зависит от интенсивности пентозофосфатного цикла, липидного анаболизма, а также состояния субстратного потока по лимонному циклу и его стимулирования через НАДФГДГ. Необходимо также подчеркнуть, что в реакциях, катализируемых Г6ФДГ, НАДФМДГ и НАДФГДГ, осуществляется восстановление НАДФ⁺ до НАДФН. Восстановленный никотинамиддинуклеотидфосфат может быть использован в реакциях НАДФН-оксидазы для синтеза супероксид-радикала (наиболее бактерицидная активная форма кислорода), антиоксидантной системы и макромолекулярного синтеза. На 14 и 24 сутки взаимосвязи между фенотипом нейтрофилов и внутриклеточной активностью исследуемых оксидоредуктаз отсутствуют, что, по-видимому, определяется миграцией активированных клеток в очаг воспаления, изменением активности внутриклеточных ферментов под воздействием различных регуляторных факторов и, в том числе, методов послеоперационной терапии РГП.

Таким образом, у больных РГП уже в дооперационном периоде повышено содержание CD62L⁺-, HLA-DR⁺- и CD64⁺-нейтрофилов в крови. Высокий уровень содержания CD62L⁺-клеток сохраняется в течение 24 суток послеоперационного периода, тогда как количество HLA-DR⁺- и CD64⁺-нейтрофилов на 24 сутки послеоперационного периода снижается до контрольного уровня. Динамике изменения содержания CD64⁺-клеток в периферической крови больных РГП соответствует уровень экспрессии CD64-рецептора на мембране нейтрофильных гранулоцитов. Метаболизм нейтрофилов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде характеризуется высокой интенсивностью субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, низкой активностью НАДФГДГ и аэробной реакции ЛДГ. В дооперационном периоде и в течение 14 дней послеоперационного периода в нейтрофильных грануло-

цитах больных выявляется высокая активность анаэробной реакции ЛДГ, характеризующая повышенную активность анаэробного гликолиза. В конце послеоперационного периода интенсивность анаэробной энергетики в нейтрофилах больных РГП снижается до контрольного уровня. Завершающий этап послеоперационного лечения со стороны метаболизма нейтрофилов больных РГП также характеризуется активацией пентозофосфатного цикла, низкой активностью малат-аспартатного шунта митохондрий и высокой интенсивностью субстратного взаимодействия между лимонным циклом и реакциями аминокислотного обмена. С помощью корреляционного анализа установлено, что если у здоровых людей количество нейтрофилов с экспрессией активационных маркеров и уровень их экспрессии на мембране взаимосвязан с состоянием с интенсивностью внутриклеточных перекисных процессов и анаболизма липидов, то у больных РГП в дооперационном периоде количество HLA-DR⁺-нейтрофилов в крови взаимосвязано с интенсивностью субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот и глутатион-зависимой антиоксидантной системы. На 7 сутки послеоперационного периода выявляются корреляционные взаимосвязи, определяющие метаболический механизм миграционной активности нейтрофильных гранулоцитов, а также зависимость уровня экспрессии высокоаффинного рецептора к Fc-фрагментам иммуноглобулинов G от активности липидного анаболизма, субстратного потока по лимонному циклу и его стимулирования через НАДФГДГ. На 14 и 24 сутки послеоперационного периода взаимосвязи между фенотипом нейтрофилов и внутриклеточной активностью исследуемых оксидоредуктаз у больных РГП отсутствуют. Предполагается, что подобная дисрегуляция между фенотипом и системой внутриклеточного метаболизма нейтрофилов связана с миграцией активированных клеток в очаг воспаления, изменением активности внутриклеточных ферментов под воздействием различных регуляторных факторов и, в том числе, методов послеоперационной терапии перитонита.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Список литературы/References

1. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. Новосибирск: Изд-во СО РАН. 2012. 456 с. [Knorre D.G., Myzina S.D. *Biologicheskaya khimiya* [Biological chemistry]. *Novosibirsk: Publishing House of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2012. 456 p.]
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного 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. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ).]

3. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 5. С. 656–660. [Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 159, no. 5, pp. 656–660. doi: 10.1007/s10517-015-3049-8 (In Russ).]
4. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitoveckij D.E., Borisov A.G. Immunometabolicheskie narusheniya pri rasprostranennom gnoynom peritonite [Immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis]. *Novosibirsk: Nauka*, 2013. 142 p.]
5. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunologiya [Immunology]. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2010, 752 p.]
6. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem. Biophys.*, 2014, vol. 68, no. 3, pp. 475–478. doi: 10.1007/s12013-013-9750-1
7. Azevedo E.P., Rochael N.C., Guimarães-Costa A.B., De Souza-Vieira T.S., Ganihlo J., Saraiva E.M., Palhano F.L., Foguel D. A metabolic shift toward pentose phosphate pathway is necessary for amyloid fibril- and phorbol 12-myristate 13-acetate-induced neutrophil extracellular trap (NET) formation. *J. Biol. Chem.*, 2015, vol. 290, no. 36, pp. 22174–22183. doi: 10.1074/jbc.M115.640094
8. Boer K., Vogelsang H., Deufel T., Pfister W., Kiehltopf M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin. Biochem.*, 2010, vol. 43, no. 16–17, pp. 1351–1355. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.003
9. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 95, pp. 27–42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
10. Dang Y., Lou J., Yan Y., Yu Y., Chen M., Sun G., Li N. The role of the neutrophil Fcγ receptor I (CD64) index in diagnosing spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. *Int. J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 49, pp. 154–160. doi: 10.1016/j.ijid.2016.06.021
11. De Jong E., De Lange D.W., Beishuizen A., Van de Ven P.M., Girbes A.R., Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2016, vol. 38, no. 5, pp. 576–584. doi: 10.1111/ijlh.12545
12. Deng X., Deng T., Ni Y., Zhan Y., Huang W., Liu J., Liao C. Cytochrome c modulates the mitochondrial signaling pathway and polymorphonuclear neutrophil apoptosis in bile duct-ligated rats. *Exp. Ther. Med.*, 2016, vol. 12, no. 1, pp. 333–342. doi: 10.3892/etm.2016.3313
13. Genel F., Atlihan F., Gulez N., Kazanci E., Vergin C., Terek D.T., Yurdun O.C. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World J. Pediatr.*, 2012, vol. 8, no. 1, pp. 72–75. doi: 10.1007/s12519-011-0304-6
14. Lavoie-Lamoureux A., Moran K., Beauchamp G., Mauel S., Steinbach F., Lefebvre-Lavoie J., Martin J.G., Lavoie J.P. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2010, vol. 299, no. 4, pp. L472–L482. doi: 10.1152/ajplung.00135.2009
15. Macedo L.W., Cararo J.H., Maravai S.G., Gonçalves C.L., Oliveira G.M., Kist L.W., Guerra Martinez C., Kurtenbach E., Bogo M.R., Hipkiss A.R., Streck E.L., Schuck P.F., Ferreira G.C. Acute carnosine administration increases respiratory chain complexes and citric acid cycle enzyme activities in cerebral cortex of young rats. *Mol. Neurobiol.*, 2016, vol. 53, no. 8, pp. 5582–5590. doi: 10.1007/s12035-015-9475-9
16. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, pp. 191–200. doi: 10.1038/nri3158
17. Mastej K., Adamiec R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol.*, 2008, vol. 45, no. 3, pp. 183–190. doi:10.1007/s00592-008-0040-0
18. Peters B.M., Noverr M.C. *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 6, pp. 2178–2189. doi: 10.1128/IAI.00265-13
19. Pliyev B.K., Sumarokov A.B., Buriachkovskaia L.I., Menshikov M. Extracellular acidosis promotes neutrophil transdifferentiation to MHC class II-expressing cells. *Cell Immunol.*, 2011, vol. 271, no. 2, pp. 214–218. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.08.020
20. Qian W., Huang G.Z. Neutrophil CD64 as a marker of bacterial infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol. Invest.*, 2016, vol. 45, no. 6, pp. 490–503. doi: 10.1080/088520139.2016.1177540
21. Rodríguez-Espinosa O., Rojas-Espinosa O., Moreno-Altamirano M.M., López-Villegas E.O., Sánchez-García F.J. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology*, 2015, vol. 145, no. 2, pp. 213–224. doi: 10.1111/imm.12437
22. Sato T., Yoshida Y., Morita A., Mori N., Miura S. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 deficiency induces compensatory amino acid metabolism during fasting in mice. *Metabolism*, 2016, vol. 65, no. 11, pp. 1646–1656. doi: 10.1016/j.metabol.2016.08.005
23. Schuster D.P., Brody S.L., Zhou Z., Bernstein M., Arch R., Link D., Mueckler M. Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2007, vol. 292, no. 4, pp. L845–L851. doi: 10.1152/ajplung.00350.2006
24. Shashidharan P., Plaitakis A. The discovery of human of GLUD2 glutamate dehydrogenase and its implications for cell function in health and disease. *Neurochem. Res.*, 2014, vol. 39, no. 3, pp. 460–470. doi: 10.1007/s11064-013-1227-5
25. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.*, 2015, vol. 268, no. 1, pp. 222–235. doi:10.1111/imr.12340
26. Van der Meer W., Stephen Scott C., Verlaet C., Gunnewiek J.K., Warris A. Measurement of neutrophil membrane CD64 and HLA-DR in a patient with abdominal sepsis. *J. Infect.*, 2006, vol. 53, no. 1, pp. e43–e46. doi: 10.1016/j.jinf.2005.09.003
27. Ventura I., Vega A., Chacón P., Chamorro C., Aroca R., Gómez E., Bellido V., Puente Y., Blanca M., Monteseirín J. Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy*, 2014, vol. 69, no. 7, pp. 898–905. doi: 10.1111/all.12414

28. Verschoor C.P., Loukov D., Naidoo A., Puchta A., Johnstone J., Millar J., Lelic A., Novakowski K.E., Dorrington M.G., Loeb M., Bramson J.L., Bowdish D.M. Circulating TNF and mitochondrial DNA are major determinants of neutrophil phenotype in the advanced-age, frail elderly. *Mol. Immunol.*, 2015, vol. 65, no. 1, pp. 148–156. doi: 10.1016/j.molimm. 2015.01.015
29. Walmsley S.R., Whyte M.K. Neutrophil energetics and oxygen sensing. *Blood*, vol. 123, no. 18, pp. 2753–2754. doi: 10.1182/blood-2014-03-560409

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Гвоздев И.И., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Мошев А.В., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Черданцев Д.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Первова О.В., д.м.н., профессор кафедры и клиникой хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

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

Gvozdev I.I., Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Moshev A.V., Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Cherdancev D.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department and Clinic of Surgical Diseases named after prof. A.M. Dykhno with a Course of Endoscopy and Endosurgery, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Pervova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department and Clinic of Surgical Diseases named after prof. A.M. Dykhno with a Course of Endoscopy and Endosurgery, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

ВНЕБОЛЬНИЧНЫЕ ПНЕВМОНИИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ЭТИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАЗОФАРИНГЕАЛЬНОГО НОСИТЕЛЬСТВА *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

Л.Т. Баязитова^{1,3}, О.Ф. Тюпкина¹, Т.А. Чазова¹, Ю.А. Тюрин^{1,3}, Г.Ш. Исаева^{1,3},
А.З. Зарипова¹, М.А. Патяшина², Л.Г. Авдонина², Л.Р. Юзлибаева²

¹ ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

² Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Татарстан (Татарстан), г. Казань, Россия

³ ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Резюме. Проведена оценка распространенности пневмококкового носительства у детей дошкольного возраста (часто болеющих детей с респираторными заболеваниями и практически здоровых организованных детей); изучены микробиологические особенности выделенных клинических изолятов *S. pneumoniae*. В исследование включены 511 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от часто болеющих детей с респираторными заболеваниями в возрасте от 6 месяцев до 7 лет в период с 2009 по 2016 гг., и 47 изолятов, выделенных от 200 практически здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения г. Казани (2016 г.). Среди 343 штаммов *S. pneumoniae* 76 изолятов были выделены в 2009–2011 гг., 82 штамма — в 2012–2013 гг.; 87 штаммов — в 2014 г.; 98 штаммов — в 2015 г.; 168 штаммов — в 2016 г. Анализ микробиоценоза носоглотки часто болеющих детей показал, что *S. pneumoniae* высевается в 32,9% случаев, причем у 58,4% детей — в виде монокультуры; степень колонизации (10^4 – 10^6 КОЕ/мл). У 41,6% детей пневмококки контаминировали носоглотку в составе бактериальных ассоциаций с другими респираторными патогенами (*S. aureus*, *Moraxella* spp., *Haemophilus* spp.). Анализ характера микробиоценоза носоглотки детей в возрасте 2,5–7 лет, посещающих детские дошкольные учреждения г. Казани (n = 200), показал, что у 47 детей наблюдается контаминация *S. pneumoniae* (23,5%). При этом у 82,9% детей пневмококки выделены в монокультуре, степень контаминации составила 10^3 – 10^6 КОЕ/мл. По данным серотипирования, носоглотку часто и длительно болеющих детей в г. Казани колонизируют серотипы пневмококков, которые покрываются 13-валентной конъюгированной вакциной. Полученные данные о динамике антибиотикочувствительности изолятов *S. pneumoniae*, циркулирующих у часто болеющих детей с респираторной патологией, в г. Казани в 2009–2015 гг., позволяют констатировать высокую активность β -лактамовых антибиотиков (от 96 до 90,8% чувствительных изоля-

Адрес для переписки:

Баязитова Лира Табрисовна
420015, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Большая Красная, 67.
Тел.: 8 (843) 236-67-91.
E-mail: bajalt@mail.ru

Contacts:

Lira T. Bayazitova
420015, Russian Federation, Republic of Tatarstan, Kazan,
Bol'shaya Krasnaya str., 67.
Phone: +7 (843) 236-67-91.
E-mail: bajalt@mail.ru

Библиографическое описание:

Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш.,
Зарипова А.З., Патяшина М.А., Авдонина Л.Г., Юзлибаева Л.Р.
Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии
и микробиологические аспекты назофарингеального носительства
Streptococcus pneumoniae у детей в Республике Татарстан // Инфекция
и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 271–278. doi: 10.15789/2220-7619-2017-
3-271-278

Citation:

Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A., Tyurin Y.A., Isaeva G.S.,
Zaripova A.Z., Patyashina M.A., Avdonina L.G., Yuzlibaeva L.R. Community-
acquired pneumonia pneumococcal etiology and microbiological aspects
of nasopharyngeal carriage in children in the Republic of Tatarstan // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3,
pp. 271–278. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-271-278

тов) и клиндамицина: (94,7–91,8% чувствительных штаммов). Макролиды (азитромицин, кларитромицин) и фторхинолоны (ципрофлоксацин) обладают меньшей антибактериальной активностью в отношении изолятов *S. pneumoniae*. В носоглотке детей обнаружены штаммы *S. pneumoniae*, характеризующиеся множественной устойчивостью к antimicrobным препаратам: 3,8–9,9% в у часто болеющих детей и у 8,5% организованных детей-бактерионосителей. Выявление уровня носительства *S. pneumoniae* и слежение за динамикой антибиотикорезистентности и серотиповым составом назофарингеальных пневмококков позволит оптимизировать профилактику, лечение пневмококковых инфекций у детей дошкольного возраста.

Ключевые слова: пневмококковые инфекции, внебольничная пневмония, носительство, антибиотикорезистентность, серотипирование, *Streptococcus pneumoniae*.

COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA PNEUMOCOCCAL ETIOLOGY AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF NASOPHARYNGEAL CARRIAGE IN CHILDREN IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN

Bayazitova L.T.^{a,c}, Tyupkina O.F.^a, Chazova T.A.^a, Tyurin Y.A.^{a,c}, Isaeva G.S.^{a,c}, Zaripova A.Z.^a, Patyashina M.A.^b, Avdonina L.G.^b, Yuzlibaeva L.R.^b

^a Kazan Scientific-Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation

^b Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Kazan, Russian Federation

^c Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Abstract. Prevalence estimate of pneumococcus carrier in preschool age children (medically fragile children with respiratory diseases and practically healthy organized children) have been carried out; microbiological features of clinical isolates *S. pneumoniae* have been studied. 511 *S. pneumoniae* strains isolated from medically fragile children with respiratory diseases aged between 6 months to 7 years during the period 2009–2016 and 47 isolates isolated from 200 practically healthy children attending preschool institutions of Kazan (2016) have been included in the research. Among 343 strains, 76 isolates were isolated during the period of 2009–2011; 82 strains — in 2012–2013; 87 strains — in 2014; 98 strains — in 2015; 168 strains — in 2016. Analysis of microbiocenosis of nasopharynx in medically fragile children showed that *S. pneumoniae* was sowed in 32.9% cases. In 58.4% of children it was as a monoculture (degree of colonization is 10^4 – 10^6 CFU/ml). *S. pneumoniae* contaminated nasopharynx in bacterial associations with other respiratory pathogens (*S. aureus*, *Moraxella* spp., *Haemophilus* spp.) in 41.6% of children. The analysis of microbiocenosis character of nasopharynx in children aged between 2.5–7 years attending preschool institutions in Kazan (n = 200) have showed that contamination *S. pneumoniae* (23.5%) was observed in 47 children. Pneumococcus have been isolated in monoculture in 82.9% of children; the contamination degree made 10^3 – 10^6 CFU/ml. According to serotyping data, nasopharynx of often and long-term ill children living in Kazan is colonized by serotypes of pneumococcus which are covered with 13 valence conjugated serum. The obtained data on the dynamics of strain *S. pneumoniae* antibiotic sensitivity among medically fragile children with respiratory diseases in Kazan during 2009–2015 showed high activity of β -lactams antibiotics (from 96 to 90.8% sensitive isolates) and clyndamicin (94.7–91.8% sensitive strains). Macrolides (azytromycin, clarytromycin) and phtorchinolons (ciprofloxacin) are less active in regard to isolates *S. pneumoniae*. *S. pneumoniae* with multiple antibiotic resistance were detected in children nasopharynx: 3.8–9.95 in medically fragile children and 8.5% in organized children-bactericides. Identification of the carrier level *S. pneumoniae* and monitoring the dynamics on antibiotic resistance and serotyping composition of nasopharyngeal pneumococcus will optimize prevention and treatment of infections *S. pneumoniae* in preschool children.

Key words: pneumococcal infection, community acquired pneumoniae, carrier, antibiotic resistance, serotyping, *Streptococcus pneumoniae*.

Введение

Внебольничные пневмонии (ВП) остаются одной из ведущих причин заболеваемости, госпитализации и смертности, являясь очень сложной проблемой здравоохранения как в индустриально развитых, так и развивающихся странах. Ряд исследований, проведенных в Европе, отмечают, что распространенность *Streptococcus pneumoniae* при пневмококк-ассоциированных заболеваниях различается в зависимости от региона, клинических про-

явлений, возраста больных и указывают на то, что этот патоген наиболее часто изолируют у пациентов с пневмониями, у пациентов старше 60 лет, у ВИЧ-инфицированных и у страдающих ХОБЛ [9]. Согласно опубликованным зарубежным данным, частота обнаружения *S. pneumoniae* при ВП варьирует в пределах от 5 до 35% от выявленных случаев. Так, исследования, проведенные в Европе в 2014 г., указывают на то, что пневмококк как наиболее частый возбудитель ВП, является причиной заболевания в 35% случаев [10]. По результатам

изучения этиологии ВП в Германии (изучено 7400 больных) возбудитель обнаружен у 32% пациентов с пневмониями [7]. Исследования, проведенные в США, показали, что пневмококк является вторым после риновирусов по распространенности — 18,5% случаев [6]. В другом подобном исследовании комплексную микробиологическую расшифровку ВП удалось провести только в 38% случаев, при этом пневмококк был изолирован в 5% случаев [5]. Такой разброс в показателях распространенности *S. pneumoniae* при ВП может объясняться трудностями при получении адекватных образцов из нижних отделов дыхательных путей, различиям в чувствительности диагностических тестов, использованием антибиотиков до проведения диагностики.

Официальная регистрация ВП в Республике Татарстан проводится с 2012 г., ежегодно в республике регистрируется от 12 000 до 17 000 случаев. Однако показатели заболеваемости ВП не отражают истинной заболеваемости, ограничены сведения о распространенности нетяжелых клинических форм, что связано вопросами поздней диагностики или гиподиагностики (скрытые под «маской» ОРЗ и ОРВИ нетяжелые клинические формы, попытки самолечения). В соответствии с официальной статистикой в 2016 г. в Республике Татарстан зарегистрировано 12 999 случаев заболеваний ВП, показатель на 100 тыс. населения составил 337,4; в сравнении с 2015 г. уровень заболеваемости ниже на 2,2% (2015 г. — 344,9 на 100 тыс. населения). Уровень заболеваемости ВП по итогам 2016 г. ниже среднефедеративного уровня на 19,3%.

В структуре заболевших ВП среди детей до 17 лет зарегистрировано 4604 случая (показатель — 589,8); удельный вес заболевших ВП детей составил 35,4%. Среди детей наиболее высокий показатель заболеваемости отмечен в возрастных группах 0–2 года — 1874 случая (1174,6 на 100 тыс. населения данной группы) и 3–6 лет — 1590 случаев (808,9).

Из числа заболевших лабораторно обследовано 6433 человека, или 49,5% пациентов. Всего лабораторно расшифровано 2287 случаев (17,6% от числа зарегистрированных). Анализ этиологической структуры ВП показал, что пневмонии, вызванные бактериями, составили 17,5% от числа зарегистрированных (2281 случай), среди которых удельный вес пневмоний, вызванных пневмококком, составил 23,0% (525 случаев) от общего числа лабораторно подтвержденных. Таким образом, *S. pneumoniae* является одним из ведущих этиологических агентов ВП в Республике Татарстан.

Как известно, *Streptococcus pneumoniae* — это условно-патогенный микроорганизм, отнесенный к IV группе патогенности, является комменсальной микрофлорой, компонентом нормомикробиоценоза носоглотки. Пневмококки встречаются в микробиоте носоглотки у детей-бактерионосителей; носительство проходит, как правило, бессимптомно, но при развитии пневмококковой инфекции в качестве возбудителя выступает предшествующий носоглоточный штамм [2]. Дети раннего возраста являются особой группой риска из-за высокой восприимчивости к пневмококковой инфекции. У детей первого полугодия жизни сохраняются материнские антитела, и по мере снижения уровня антител заболеваемость возрастает. Резкое снижение титра наблюдается со 2-го полугодия жизни. До 3-летнего возраста уровень антител к *S. pneumoniae* остается низким. Носительство одного серотипа пневмококка может длиться от одного до нескольких месяцев, затем данный серотип элиминируется, но возможна колонизация другим серотипом пневмококка. При колонизации новым штаммом *S. pneumoniae* у 15% детей в течение месяца развивается заболевание, чаще всего острый средний отит. Доказано, что носители пневмококков — эпидемиологически значимый источник горизонтального распространения данного микроба [8]. Назофарингеальные штаммы пневмококков являются резервуаром микроорганизмов, обладающих генами антибиотикорезистентности. В бактериальной популяции развиваются процессы формирования, распространения и эволюции отдельных генетических линий (клонов или клональных комплексов); происходит горизонтальный обмен генами, кодирующими вирулентность. Обмен генами возможен также и с другими бактериями рода *Streptococcus* (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*) [1].

По литературным данным, этиологию ВП представляется возможным установить не более чем в 50% случаях. Диагностика, как правило, базируется на клинических данных, а подтверждение пневмококковой этиологии заболевания проводится при менингите и бактериемии и редко — у пациентов с острым средним отитом. В связи с частым и необоснованным применением антимикробных препаратов самими пациентами (как правило, без показаний) происходит селекция резистентных штаммов возбудителя [3].

Таким образом, частая встречаемость респираторных инфекций пневмококковой этиологии у детей дошкольного возраста, возможность развития инвазивных жизне-

угрожающих заболеваний, увеличение доли циркулирующих резистентных штаммов, обосновывают необходимость проведения исследований по слежению за пневмококковым бактерионосительством и мониторинга антибиотикорезистентности пневмококков.

Цель исследования: оценить распространенность пневмококкового носительства у детей дошкольного возраста (часто болеющих детей с респираторными заболеваниями и практически здоровых организованных детей); изучить микробиологические особенности выделенных клинических изолятов *S. pneumoniae*.

Материалы и методы

В исследование включены 511 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от часто болеющих детей с респираторными заболеваниями в возрасте от 6 месяцев до 7 лет в период с 2009 по 2016 гг., и 47 изолятов, выделенных от 200 практически здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения г. Казани (2016 г.). Среди 343 штаммов *S. pneumoniae* 76 изолятов были выделены в 2009–2011 гг., 82 штамма — в 2012–2013 гг.; 87 штаммов — в 2014 г.; 98 штаммов — в 2015 г.; 168 штаммов — в 2016 г. Материал высеивали на Columbia agar Base («Conda», Испания) с добавлением 5% крови. Посевы инкубировали в CO₂-инкубаторе 24 ч. Фенотипическую идентификацию *S. pneumoniae* проводили на основании морфологических, культуральных данных. Для дифференциальной диагностики использовали оптохиновый тест; лизис в присутствии солей желчи. Для серологической диагностики применяли латекс-агглютинацию «Slidex Pneumo-Kit», («bioMérieux», Франция); постановку реакции

Нейфельда с пневмококковой антисывороткой OMNI (SSI Omni serum, Statens Serum Institut). Тестирование антибиотикорезистентности и интерпретацию результатов проводили согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2015), EUCAST (2015 г.). Для скрининга пенициллинчувствительности использовали диск с оксациллином 1 мкг («bioMérieux», Франция). Профиль антибиотикочувствительности изолятов изучали при помощи диско-диффузионного метода; для оценки чувствительности к β-лактамам антибиотикам использовали E-тесты (HiComb MIC Test, «Himedia»). МПК пенициллина и амоксициллина определяли методом E-теста. Чувствительными считали изоляты с МПК ≤ 0,6 мкг/мл, нечувствительными к пенициллину — штаммы с МПК ≥ 0,06 мкг/мл. Молекулярное серотипирование штаммов *S. pneumoniae* методом мультиплексной ПЦР (МПЦР) изучалось с использованием праймеров наиболее значимых в эпидемиологическом аспекте серотипов (ООО «Синтол», Россия).

Результаты

Обследование часто болеющих респираторными заболеваниями детей дошкольного возраста

Анализ микробиоценоза носоглотки часто болеющих детей показал, что *S. pneumoniae* высеивается в 32,9% случаев, причем у 58,4% детей — в виде монокультуры; степень колонизации (10⁴–10⁶ КОЕ/мл). У 41,6% детей пневмококки контаминировали носоглотку в составе бактериальных ассоциаций с другими респи-

Таблица 1. Уровень антибиотикочувствительности *S. pneumoniae* к β-лактамам антибиотикам за период с 2009–2016 гг.

Table 1. Levels of antibiotic susceptibility of *S. pneumoniae* to β-lactam antibiotics, for the period 2009–2016

Исследуемый период Investigated period	n Number of strains	Доля чувствительных к пенициллину штаммов, абс./%, 95% CI Ratio of strains sensitive to penicillin, abs./%, 95% CI	Доля штаммов, чувствительных к амоксициллину, абс./%, 95% CI Ratio of strains sensitive to amoxicillin, abs./%, 95% CI
2009–2011 гг.	76	67/88,2% (79–93,6)	73/96,1% (89,0–98,6)
2012–2013 гг.	82	71/86,6% (77,6–92,3)	76/92,7% (85,0–97,0)
2014 г.	87	74/85,1% (76,1–91,1)	80/91,9% (84,3–96,1)
2015 г.	98	83/84,7 (76,3–90,5)*	89/90,8% (83,4–95,1)*
2016 г.	168	141/83,9 (77,3–88,9)*	151/89,8 (84,0–93,8)*

Примечание. *p ≤ 0,05.

Note. *p ≤ 0,05.

Таблица 2. Уровень антибиотикочувствительности *S. pneumoniae* к макролидам за период 2009–2016 гг.Table 2. Levels of antibiotic susceptibility of *S. pneumoniae* to macrolides, for the period 2009–2016

Исследуемый период Investigated period	n Number of strains	Доля чувствительных штаммов к азитромицину, абс./%, 95% CI Ratio of strains sensitive to azithromycin, abs./%, 95% CI	Доля чувствительных штаммов к кларитромицину, абс./%, 95% CI Ratio of strains sensitive to clarithromycin, abs./%, 95% CI
2009–2011 гг.	76	69/90,7 (82,2–95,5)	71/93,4 (85,5–97,2)
2012–2013 гг.	82	73/89,0 (80,4–94,1)	76/92,7 (85,0–97,0)
2014 г.	87	77/88,5 (80,1–93,6)	79/90,8 (82,9–95,3)
2015 г.	98	83/84,7 (76,3–90,5)	88/89,8 (82,2–94,4)*
2016 г.	168	132/78,6 (71,4–84,4)*	143/85,1 (78,6–89,9)*

Примечание. * $p \leq 0,05$.Note. * $p \leq 0,05$.

раторными патогенами (*S. aureus*, *Moraxella* spp., *Haemophilus* spp.). Пенициллинчувствительными по результатам скрининга с 1 мкг оксациллина оказались 88,2–83,9% изолятов в зависимости от периода (табл. 1).

При анализе чувствительности к бензилпенициллину с помощью E-тестов регистрировались штаммы с промежуточной чувствительностью (МПК 0,12–1 мг/л). В период с 2009 по 2016 гг. доля чувствительных к амоксициллину штаммов уменьшилась почти на 10%: с 96,1% в 2009 г. до 85,1% в 2016 г. Статистический анализ данных уровня резистентности за исследуемый период выявил статистически достоверное увеличение доли нечувствительных штаммов, начиная с 2015 г. (табл. 1).

В исследуемый период прослеживается тенденция увеличения количества резистентных к азитромицину и кларитромицину изолятов. Так, в 2009–2011 гг. выявлено

90,7% азитромицинчувствительных и 93,4% кларитромицинчувствительных пневмококков. В 2011–2012 гг. отмечено снижение антибиотикочувствительности до 89,0 и 92,7%; в 2014 г. до 88,5 и 90,8% в 2015 г. — до 84,7 и 89,8%; в 2016 г. — 78,6 и 85,1% штаммов соответственно. Сравнительный анализ данных за весь период исследования (2009–2016 гг.) продемонстрировал статистически значимый рост резистентности к кларитромицину в 2015 и 2016 гг. (табл. 2).

В период с 2009 по 2011 гг. выявлено 78,9% ципрофлоксацин-чувствительных штаммов; за 2012–2013 гг. — 74,7%; в 2014 — 74,7%; в 2015 г. — 73,5% штаммов, в 2016 г. — 72,6%, что свидетельствует о возрастании уровня резистентности за исследуемый период (табл. 3). На протяжении всего исследования отмечена достаточно высокая антипневмококковая активность клиндамицина: выявлено 94,7–91,8%

Таблица 3. Уровень антибиотикочувствительности *S. pneumoniae* к ципрофлоксацину и клиндамицину за период 2009–2016 гг.Table 3. Dynamics of antibiotic susceptibility of *S. pneumoniae* to ciprofloxacin and clindamycin, for the period 2009–2016

Исследуемый период Investigated period	n Number of strains	Доля чувствительных штаммов к ципрофлоксацину, абс./%, 95% CI Ratio of strains sensitive to ciprofloxacin, abs./%, 95% CI	Доля чувствительных штаммов к клиндамицину, абс./%, 95% CI Ratio of strains sensitive to clindamycin, abs./%, 95% CI
2009–2011 гг.	76	60/78,9 (68,5–87,0)	72/94,7 (87,2–98,0)
2012–2013 гг.	82	62/75,6 (65,3–83,6)	77/93,9 (86,5–97,4)
2014 г.	87	65/74,7 (64,7–82,7)	81/93,1 (85,7–96,8)
2015 г.	98	72/73,5 (63,4–81,6)	90/91,8 (84,7–95,8)*
2016 г.	168	122/72,6 (65,1–79,0)*	152/90,5 (84,7–94,3)*

Примечание. * $p \leq 0,05$.Note. * $p \leq 0,05$.

Таблица 4. Уровень чувствительности штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от детей-носителейTable 4. Levels of antibiotic susceptibility of strains, isolated from the children — carrier *S. pneumoniae*

n Number of strains	Доля чувствительных штаммов/Sensitive strains levels					
	к пенициллину, абс./%, 95% CI to penicillin, abs./%, 95% CI	к амоксициллину, абс./%, 95% CI to amoxicillin, abs./%, 95% CI	к азитромицину, абс./%, 95% CI to azithromycin, abs./%, 95% CI	к кларитромицину, абс./%, 95% CI to clarithromycin, abs./%, 95% CI	к ципрофлоксацину, абс./%, 95% CI to ciprofloxacin, abs./%, 95% CI	к клиндамицину, абс./%, 95% CI to clindamycin, abs./%, 95% CI
47	40/85,1 (71,0–93,3)	45/95,7 (84,3–99,3)	36/76,5 (61,6–87,2)	40/85,1 (71,0–93,3)	36/76,6 (61,6–87,2)	43/91,5 (78,7–97,2)

Примечание. * $p \leq 0,05$.Note. * $p \leq 0,05$.

чувствительных штаммов в зависимости от периода исследования. Но, начиная с 2015 г., отмечается статистически значимый рост количества устойчивых штаммов (относительно периода 2009–2011 гг.) (табл. 3).

В носоглотке часто болеющих детей обнаружены *S. pneumoniae*, характеризующиеся множественной устойчивостью к антимикробным препаратам (к 3 и более АМП) — 3,8–9,9% в зависимости от года исследования.

Анализ серотипового состава *S. pneumoniae* ($n = 116$) показал преобладание «вакцинных» серотипов 3, 6А (4,3%), 6В (3,4%), 19А, 19F (3,4%), 14 и 19А, 23F и одного «невакцинного» штамма 33F (3,4%). 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина, используемая для вакцинации в соответствии с национальным календарем профилактических прививок, включает серотипы: 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F, 23F, 19А и покрывает практически все выделенные нами серотипы пневмококка.

Обследование практически здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения г. Казани

Обследовано 200 детей в возрасте 2,5–7 лет, посещающих детские дошкольные учреждения г. Казани. Анализ характера микробиоценоза носоглотки обследованных детей показал, что у 47 детей наблюдается контаминация *S. pneumoniae* (23,5%). При этом у 82,9% детей пневмококки выделены в монокультуре, степень контаминации составила 10^3 – 10^6 КОЕ/мл. Анализ данных антибиотикорезистентности показал, что уровень чувствительности изолятов пневмококков, контаминирующих носоглотку детей-носителей, незначительно выше, по сравнению с часто болеющими детьми. Так, по результатам скрининга с оксациллином

выявлено, что 85,1% штаммов чувствительны к β -лактамам антибиотикам, что сопоставимо с группой часто болеющих детей в 2016 г., у которых зарегистрировано 83,9% чувствительных штаммов. Но в то же время доля амоксициллинчувствительных изолятов, выделенных от здоровых детей-носителей, была выше и составила 95,7% (табл. 4); в группе часто болеющих детей количество амоксициллинчувствительных изолятов составляло 89,8%.

Не выявлено статистически достоверных различий и в уровне чувствительности *S. pneumoniae* к макролидам: регистрируется более высокая чувствительность к кларитромицину (количество азитромицинчувствительных изолятов — 76,5%, а кларитромицинчувствительных изолятов — 85,1% штаммов). По данным литературы, устойчивость к макролидам преимущественно обусловлена механизмом эффлюкса и, как правило, связана с более низким уровнем устойчивости к макролидам и распространена в Северной Америке, либо с механизмом рибосомального метилирования, что, как правило, связано с более высоким уровнем резистентности и более распространено в Европе [4]. При этом также формируются патогены с обоими механизмами устойчивости, что не может не вызывать озабоченность по вопросу повышения уровня устойчивости пневмококков к макролидам и неэффективности их использования в монотерапии пневмококк-ассоциированных пневмоний.

Отмечается более высокий уровень чувствительности штаммов (91,5%), выделенных от детей-носителей, к клиндамицину, в группе часто болеющих детей — 90,5% чувствительных к данному препарату изолятов. Частота выделения ципрофлоксацинчувствительных изолятов составила 76,6%, в то время как

у часто болеющих детей выявляется 72,6% таких штаммов (табл. 4). Из носоглотки 8,5% детей-носителей высеяны штаммы с множественной резистентностью к антибиотикам.

Выводы

1. Распространенность пневмококкового носительства в носоглотке у детей, посещающих детские дошкольные учреждения г. Казани, составляет 23,5 и 32,9% у часто болеющих детей.
2. По данным серотипирования, носоглотку часто и длительно болеющих детей в г. Казани колонизируют серотипы пневмококков, спектр которых покрывается 13-валентной конъюгированной вакциной.
3. Полученные данные о динамике антибиотикочувствительности изолятов *S. pneumoniae*, циркулирующих у часто болеющих детей с респираторной патологией, в г. Казани в 2009–2015 гг., позволяют констатировать высокую активность β-лактамовых антибиотиков (от 96 до 90,8% чувствительных изолятов) и клиндамицина (94,7–91,8% чувствительных штаммов).
4. Макролиды (азитромицин, кларитромицин) и фторхинолоны (ципрофлоксацин) обладают меньшей антибактериальной активностью в отношении изолятов *S. pneumoniae*.
5. В носоглотке детей обнаружены штаммы *S. pneumoniae*, характеризующиеся множе-

ственной устойчивостью к антимикробным препаратам: 3,8–9,9% в у часто болеющих детей и у 8,5% организованных детей-бактерионосителей.

Заключение

Таким образом, выявленные уровни пневмококкового носительства в носоглотке у детей с тенденцией роста антибиотикорезистентных штаммов могут оказывать негативное влияние на распространенность внебольничных пневмоний пневмококковой этиологии. Проведение микробиологического мониторинга за серотиповым пейзажем пневмококков и циркуляцией резистентных штаммов среди детей-носителей, санация носительства и применение средств специфической профилактики (вакцинации) может на данном этапе оказывать сдерживающий эффект на рост ВП пневмококковой этиологии среди взрослого населения. Но несмотря на значительное воздействие использования пневмококковых вакцин на циркуляцию возбудителя сохраняются угрозы, связанные с колонизацией носоглотки невакцинными серотипами, атипичными (инкапсулированными) штаммами, сохраняющими отчасти патогенный потенциал, что обосновывает необходимость в проведении непрерывного микробиологического мониторинга и в продолжении исследований по разработке вакцин нового поколения, имеющих более широкий защитный спектр.

Список литературы/References

1. Козлов Р.С. Динамика антибиотикорезистентности *Streptococcus pneumoniae* в России (по данным многоцентрового проспективного исследования ПЕГАС 2006–2009 гг.) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010. № 4. С. 329–341. [Kozlov R.S. The dynamics of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Russia (according to a multicenter prospective study PEGASUS 2006–2009). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, no. 4, pp. 329–341. (In Russ.)]
2. Сидоренко С.В., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Королева И.С., Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики: эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России // Вопросы современной педиатрии. 2010. № 9 (1). С. 62–69. [Sidorenko S.V., Lobzin Yu.V., Kharit S.M., Koroleva I.S., Tatochenko V.K. Pneumococcal infection and modern opportunities of its prophylaxis — epidemiological review of situation in the world and Russia. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*. 2010, no. 9 (1), pp. 62–69. (In Russ.)]
3. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Surveillance report. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. *Stockholm*, 2012, pp. 51–59.
4. Cilloniz C., Ardanuy C., Vila J., Torres A. What is the clinical relevance of drug-resistant pneumococcus? *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2016, vol. 22, iss. 3, pp. 227–234. doi: 10.1097/MCP.0000000000000262
5. Jain S., Self W.H., Wunderink R.G., Fakhra S., Balk R., Bramley A.M., Reed C., Grijalva C.G., Anderson E.J., Courtney D.M., Chappell J.D., Qi C., Hart E.M., Carroll F., Trabue C., Donnelly H.K., Williams D.J., Zhu Y., Arnold S.R., Ampofo K., Waterer G.W., Levine M., Lindstrom S., Winchell J.M., Katz J.M., Erdman D., Schneider E., Hicks L.A., McCullers J.A., Pavia A.T., Edwards K.M., Finelli L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N. Engl. J. Med.*, 2015, vol. 373, iss. 5, pp. 415–427.
6. Musher D.M., Roig I.L., Cazares G., Stager C.E., Logan N., Safar H. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study. *J. Infect.*, 2013, vol. 67, iss. 1, pp. 11–18. doi: 10.1016/j.jinf.2013.03.003

7. Pletz M.W., Von Baum H., Van der Linden M., Schutte H., Welte T., Rohde G., Suttrop N. The burden of pneumococcal pneumonia — experience of the German competence network CAPNETZ. *Pneumologie*, 2012, vol. 66, iss. 8, pp. 470–475. doi: 10.1055/s-0032-1310103
8. Simell B., Auranen K., Käyhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K.L. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev. Vaccines*, 2012, vol. 11, no. 7, pp. 841–855.
9. Torres A., Blasi F., Peetermans W.E., Viegi G., Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014, vol. 33, iss. 7, pp. 1065–1079. doi: 10.1007/s10096-014-2067-1
10. Welte T., Torres A., Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*, 2012, vol. 67, iss. 1, pp. 71–79. doi: 10.1136/thx.2009.129502

Авторы:

Баязитова Л.Т., к.м.н., зав. научно-исследовательской лабораторией микробиологии ФБНУ Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Тюпкина О.Ф., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микробиологии ФБНУ Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия;

Чазова Т.А., младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микробиологии ФБНУ Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия;

Тюрин Ю.А., к.м.н., зав. научно-исследовательской лабораторией иммунологии и разработки аллергенов ФБНУ Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; ассистент кафедры биохимии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Исаева Г.Ш., д.м.н., директор ФБНУ Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; зав. кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Зарипова А.З., младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микробиологии ФБНУ Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия;

Пятышина М.А., д.м.н., руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан, г. Казань, Россия;

Авдонина Л.Г., заместитель руководителя Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан, г. Казань, Россия;

Юзлибаева Л.Р., к.м.н., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан, г. Казань, Россия.

Authors:

Bayazitova L.T., PhD (Medicine), Head of Scientific Research Laboratory of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, Microbiology Department, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Tyupkina O.F., Senior Researcher, Scientific Research Laboratory of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Kazan, Russian Federation;

Chazova T.A., Junior Researcher, Scientific Research Laboratory of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Kazan, Russian Federation;

Tyurin Y.A., PhD (Medicine), Head of Scientific Research Laboratory of Immunology And Allergens Development, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Kazan, Russian Federation;

Isaeva G.S., PhD, MD (Medicine), Director of the Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Kazan, Russian Federation; Head of Microbiology Department, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Zaripova A.Z., Junior Researcher, Scientific Research Laboratory of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Kazan, Russian Federation;

Patyashina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing Department in Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation;

Avdonina L.G., Deputy Head, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing Department in Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation;

Yuzlibaeva L.R., PhD (Medicine), Head of the Department of Epidemiological Surveillance, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing Department in Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation.

EFFICACY OF GENERIC DRUG WARTOCID® (IMIQUIMOD 5% CREAM FOR EXTERNAL USE) IN ANOGENITAL WARTS TREATMENT

V.S. Smirnov^a, S.V. Petlenko^a, S.A. Savelyev^a, G. Redlich^b, N.I. Stukan^a

^a CJSC MBSIK “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation

^b Implicit Bioscience, Woolloongabba, Australia

Abstract. *Aim.* To evaluate the efficacy and safety of the generic drug Wartocid® (Imiquimod cream 5% for external use) in patients with external anogenital (venereal) warts (AGW). *Materials and methods.* The single-blind comparative, randomized, placebo-controlled clinical trial included 50 women aged 18 to 60 with an established clinical diagnosis of AGW in the vulva and perianal region. Patients in group 1 received placebo cream for external use, while patients in group 2 received therapy with Wartocid in a daily dose of 10 mg cream/cm² of skin area. The drug was applied every other day until the complete disappearance of AGW, but in any case, not more than 16 weeks. A follow-up was carried out for 4 more weeks. The study evaluated the dynamics of subjective and objective symptoms, the presence and the frequency of relapses, and the percentage of full treatment of AGW. *Main results.* Treatment with Wartocid resulted in a complete cure of AGW in 16% of patients, and a reduction in the focus area of AGW in 36% of patients. Against the background of the placebo no dynamics of the disease were reached. Neither serious adverse events nor clinically significant changes in blood tests, urine or serum biochemical parameters in any of the patients who received treatment with Wartocid were observed. *Conclusion.* The generic drug Wartocid has been proved to be effective and safe for AGW treatment and its effectiveness is similar to the original drug Aldara® (Imiquimod cream 5% for external use).

Key words: Imiquimod, Wartocid, clinical trial, efficacy, safety, external anogenital (venereal) warts.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ПРЕПАРАТА ВАРТОЦИД® (ИМИХИМОД 5% КРЕМ ДЛЯ ВНЕШНЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ) В ЛЕЧЕНИИ АНОГЕНИТАЛЬНЫХ БОРОДАВОК

В.С. Смирнов¹, С.В. Петленко¹, С.А. Савельев¹, Г. Редлих², Н.И. Стукань¹

¹ ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт Петербург, Россия

² Implicit Bioscience, Вуллунгабба, Австралия

Резюме. *Цель.* Оценка эффективности и безопасности воспроизведенного препарата Вартоцид® (Имихимод крем 5% для наружного применения) у пациентов с наружными аногенитальными (венерическими) бородавками (АГБ). *Материалы и методы.* Простое слепое сравнительное рандомизированное плацебо-контролируемое клиническое исследование включало 50 женщин в возрасте от 18 до 60 лет с установленным клиническим диагнозом АГБ в вульве и перианальном регионе. Пациенты в группе 1 получали плацебо-крем для наружного применения, тогда как пациенты в группе 2 получали терапию Вартоцидом в суточной дозе 10 мг крема/см² области кожи. Препарат применялся через день до полного исчезновения АГБ, но в любом

Адрес для переписки:

Смирнов Вячеслав Сергеевич
191023, Россия, Санкт-Петербург, Мучной пер., д. 2,
ЗАО МБНПК «Цитомед».
Тел.: 8 911 948-59-22 (моб.).
E-mail: vssmi@mail.ru

Contacts:

Vyacheslav S. Smirnov
191025, Russian Federation, St. Petersburg, Muchnoy lane, 19,
MBRD “Cytomed”
Phone: +7 (911) 948-59-22 (mobile).
E-mail: vssmi@mail.ru

Библиографическое описание:

Смирнов В.С., Петленко С.В., Савельев С.А., Редлих Г., Стукань Н.И. Эффективность воспроизведенного препарата Вартоцид® (Имихимод 5% крем для внешнего использования) в лечении аногенитальных бородавок // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 279–284. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-279-284

Citation:

Smirnov V.S., Petlenko S.V., Savelyev S.A., Redlich G., Stukan N.I. Efficacy of generic drug Wartocid® (Imiquimod 5% cream for external use) in anogenital warts treatment // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 279–284. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-279-284

случае не более 16 недель. Последующее наблюдение проводилось еще 4 недели. В исследовании оценивалась динамика субъективных и объективных симптомов, наличие и частота рецидивов, а также процентное соотношение полного лечения от АГБ. *Основные результаты.* Лечение Вартоцидом привело к полному излечению от АГБ у 16% пациентов и снижению площади локализации АГБ у 36% пациентов. На фоне плацебо не было достигнуто никакой динамики болезни. Не наблюдалось ни серьезных побочных эффектов, ни клинически значимых изменений в анализах крови, мочи или сывороточных биохимических показателей у любого из пациентов, получавших лечение Вартоцидом. *Вывод.* Было доказано, что воспроизведенный препарат Вартоцид эффективен и безопасен для лечения АГБ, и его эффективность аналогична оригинальному препарату Aldara® (Имиквимод крем 5% для наружного применения).

Ключевые слова: Имиквимод, Вартоцид, клинические испытания, эффективность, безопасность, наружные аногенитальные (венерические) бородавки.

The prevalence of papillomavirus infections, including anogenital warts (AGW), has still persist at a high rate, accounting in 2012 for more than 26.0 cases per 100 000 in the population of the Russian Federation [14]. In other countries the prevalence of such infections is significantly higher and accounts for 196 cases per 100 000 of the population [6, 21].

The clinical implications of genital infections caused by human papillomavirus (HPV) are quite variable. There are two types of AGW: exophytic and endophytic forms. Both forms can co-exist and are usually evoked by different genotypes of HPV. Namely, benign AGW are more often evoked by low-risk HPV types 6 and 11, whereas HPV types 16 and 18 produce higher risk lesions [4, 16]. The vast majority of patients with AGW primarily carries HPV types 6 and 11. In most cases AGW are not a serious danger from a prognostic perspective, though they definitely cause some psychosocial problems for the patient [21]. However, in some cases, AGW can transform into anogenital malignancies, especially in immune-compromised patients, for example following organ transplantation and the associated immunosuppressive therapy, or when infected with HIV [17]. Depending on the anatomical location of the AGW, HPV infected patients can develop both frequent and sometimes unpleasant forms of pointed anogenital condylomas or recidivating respiratory papillomatosis, which can cause dysfunction of the upper respiratory tracts [15]. It is believed that these more serious pathologies associated with AGW are triggered by a complex of local immunosuppressive reactions manifesting in abnormal cellular responses, changes in Langerhans cell maturation, alteration in the polarization of adaptive immune responses, and the suppression of natural killer cell function [15, 18]. Pathologies can also be influenced by the expression of certain major histocompatibility complex class II alleles [8]. The capacity to produce such alterations in immune responses suggests a rationale for the use of immunocorrective drugs in HPV treatments.

A common approach for AGW treatment has been recently limited by mechanical or chemical destruction. AGW can be surgically removed, treated with cryotherapy, or treated with electrocoagulation or

chemicals (podophyllin, podophyllotoxin, fluorouracil, trichloroacetic acid etc.). However, these methods of AGW treatment are not always sufficiently effective since frequent relapses can occur because of reinfection, reactivation of viral replication, viral genome segregation, and the associated transit into an active state. One of the most significant risk factors for HPV relapse is reduction of immune defense. Hence, there is a need for identifying new therapeutic agents for AGW treatment [2].

The use of immune-modifying agents represents a new approach for AGW therapy. The most widely used drug is an imidazole derivative called imiquimod (1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine), which is structurally similar to nucleosides. This drug is widely used to treat human herpesvirus infections, and reports of its use accounts for more than 2,500 references in PubMed as of May 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Imiquimod has been approved by the US Food and Drug Administration as a pharmaceutical product against AGW and other symptoms of HPV infection. It is produced in the United Kingdom under the trade name Aldara® [27]. In November 2007 patent protection expired and several countries launched the manufacture of generic analogues [11]. The generic drug Wartocid® (Imiquimod cream 5% for external use), an analogue of the brand product Aldara, was produced and registered in the Russian Federation. Pre-clinical studies in guinea pigs showed full bioequivalence of the brand and reproduced product.

The purpose of the current study was to evaluate the efficacy and safety of Wartocid in a phase III single-blind comparative, randomized, placebo-controlled clinical trial in patients with AGW.

Materials and methods

Participants. The clinical trial included 50 women aged 18 to 60 (average age: 20.8) with AGW located in the vulva and perianal area. Gender uniformity during recruitment of the patients was due to pronounced prevalence of such pathology in females.

To exclude any sexually transmitted co-infections (STIs), all patients were examined for syphilis,

HIV, *Neisseria gonorrhoea*, chlamydial genitourinary infections, trichomoniasis, *Mycoplasma genitalium*, and genital herpes. All patients underwent a PAP test and HPV status identification by means of PCR.

A complete blood count (CBC) and blood chemistry were done prior to and following Wartocid treatment. Evaluation of blood chemistry parameters included levels of transaminase, total bilirubin, creatinine, and glucose levels.

Inclusion criteria. Patients matching the following criteria were included in this study:

- age between 18 and 70;
- presence of AGW in the form of a small fusing papillomatous rash ($\geq 1 \text{ cm}^2$) or papules/isolated warts (2 or more elements);
- negative pregnancy test (for women of child-bearing age only) and acceptance of using reliable contraception during the study and 1 month upon its completion;
- informed consent for clinical trials;
- willingness to strictly follow the doctor's recommendation regarding prescribed therapy.

Exclusion criteria. Patients were excluded if they had:

- intolerance to any components of Wartocid;
- prior therapy with drugs containing Imiquimod for 3 months before the clinical trial began;
- PAP test with a Class III, IV and V diagnosis;
- AGW with a colonic, vaginal, cervical mucosa or intraurethral localization;
- impaired liver, kidney and/or other inner organ functions associated with their decompensation, central nervous system disorders;
- STIs — syphilis, HIV, *Neisseria gonorrhoea*, chlamydial genitourinary infections, urogenital trichomoniasis, urogenital diseases, caused by *Mycoplasma genitalium*, genital herpes with signs of infectious processes;
- pregnancy, lactation;
- participation in any other clinical trials 30 days before Visit 1;
- suspicion of malignant neoplasms in the vulva;
- any serious or uncontrolled physical or mental illnesses considered by the investigator as risky for the patients in connection with their participation in the trial, illnesses which could affect the results of the trials or impede the performance by the patients of all study requirements;
- clinically significant deviations of the CBC/blood chemistry or study data, with the exception of AGW-related conditions;
- consumption of any pharmaceutical products for co-therapy, not allowed by the current protocol for clinical trials or conditions when the required period after consumption of such products had not yet been completed;
- indication in personal history of any drug dependence or alcohol abuse, which could negatively impact patient compliance;

– affiliation with research center personnel, sponsor company as well as their family members (according to GCP);

– lack of willingness to cooperate.

Study design. All participants were randomly divided into 2 groups of 25 persons. The patients in Group 1 received placebo-cream for external use, whereas the patients in Group 2 were treated with Wartocid. Maximum duration of the therapy was 16 weeks (the earlier disappearance of AGW occurred in patients allowed to complete the trial ahead-of-schedule). Upon completion of the therapeutic course all patients were observed for 4 more weeks.

The drug was applied for 6–10 hours (mainly at night) on a washed (using soap with neutral pH) and dried area of lesional skin by means of gentle application using a tube tip as an applicator. After a period of 6–10 hours, the treated skin was washed under running water (using soap with neutral pH).

A single dose of the drug was approximately 10 mg/cm² of skin surface (a treated area of 2 mm in width and 5 mm in length).

Estimation of therapeutic efficacy was performed on day 21 \pm 2 (visit 3), 35 \pm 2 (visit 4), 63 \pm 7 (visit 5), 91 \pm 7 (visit 6), 119 \pm 7 (visit 7) and 147 \pm 7 (visit 8) according to the following criteria:

- presence/absence of subjective symptoms of disease (patient complaints);
- presence/absence of objective symptoms of disease;
- frequency of AGW relapses;
- percentage of patients who stopped their participation in the clinical trial ahead-of-schedule due to inefficiency;
- estimation of therapeutic efficacy by a doctor (clinical outcome);
- estimation of therapeutic efficacy by the patient.

The following parameters were also evaluated:

- percentage of patients who were completely cured during therapy;
- percentage of patients in which the AGW amount or area were decreased during therapy;
- presence and intensity of subjective clinical symptoms of disease.

Intensity of each parameter was assessed according to a scale of 0 to 3: 0 — absence, 1 — weak, 2 — moderate, 3 — strong.

The patient self-assessed the total therapeutic efficacy according to a scale of 1 to 4: 1 — significant improvement, 2 — slight improvement, 3 — unchanged, 4 — deterioration.

For the doctor's assessment of therapeutic efficacy, symptoms were assessed according to a scale of 1 to 5: 1 — clinical convalescence, 2 — significant improving, 3 — improving, 4 — unchanged, 5 — deterioration.

Statistical analyses. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.04 software

(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). All data were expressed as mean (M)±standard error (SEM). Statistical significance is reported at $p < 0.05$. All the data underwent testing for normal distribution (D'Agostino&Pearson omnibus normality test). Rash intensity, itching, pain, rash area and efficacy by patient/doctor were analyzed using a repeated one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test (within group comparison of normally distributed data) and a Friedman rank sum test followed by a Dunns post-hoc test (within group comparison of non-normally distributed data). The intergroup comparison was assessed at one point (final visit 8) using an unpaired t-test (for normally distributed data) or Mann–Whitney U-test (when data failed the normality test).

All the blood and urine parameters were analyzed using a paired t-test (for normally distributed data within one group), an unpaired t-test (for normally distributed data for intergroup comparison), a Wilcoxon matched pairs test (for non-normally distributed data within group) and a Mann–Whitney test (for non-normally distributed data for intergroup comparison).

Results and discussion

In the current study the dynamics of subjective and objective indicators were assessed in all patients. Among patients from Group 1 (placebo) no significant changes were found in rash intensity, pain, rash area (Table 1).

Patients treated with Wartocid cream showed a reduced number of AGW ($F(6,25) = 16.5$; $p = 0.011$) though this effect was not statistically significant when compared to placebo group ($U = 270.5$; $p = 0.36$). A more apparent response was observed when rash surface area was measured. Namely, on Visit 1, mean rash areas were statistically identical in Group 1 and 2 (2.30 vs. 2.28 cm² respectively)

(Table 1). Placebo decreased AGW area by 0.06 cm² at a maximum, i.e. by 2.6% ($F(6,24) = 1.301$; $p = 0.26$), whereas Wartocid, especially near the end of the treatment period (visit 8), decreased lesion sizes by 0.68 sm² or 28% ($F(6,24) = 8.364$; $p < 0.0001$) and this effect was statistically significant when compared to placebo ($t = 2.2$; $p = 0.032$). The surface area analysis of each patient revealed that 3 people from Group 1 (12%) exhibited a reduction of the lesional area and in 1 person (4%) such an area expanded. In Group 2, already by Visit 3, a reduction of the lesional area was noted in 6 patients (24%), and by the end of the treatment period it reached 52% (13 patients), 4 patients of which (16%) showed full convalescence while the rest of the 9 patients (36%) exhibited significant AGW reduction.

Imiquimod is considered to be an effective non-invasive immune-modifying remedy against STIs and in particular against pointed anogenital condylomas [5, 10], since it affects both innate and adaptive immune systems. By binding with the toll-like receptors 7 on the plasmacyte-like dendrites, imiquimod causes proinflammatory cytokine secretion [3, 23] with subsequent activation of Th1 and inhibition of Th2 immune responses leading to Langerhans cells migration to local lymph nodes and elevation of antigen presentation by naïve T-cells. In other words, the mechanism of antiviral action of imiquimod is indirect and its effects are mediated mostly via secretion of IFN α/β , thus modulating course and outcome of infectious process [23, 26]. The regress of AGW observed in our study was most likely due to cell-dependent immune response caused by local induction of cytokines and cellular infiltration [7].

As for clinical manifestations, for example, itch intensity and pain syndrome in the AGW area, patients in Group 2 displayed a higher itch intensity level than patients in Group 1, whereas pain syndrome was higher in patients in Group 1. It seems likely that the decrease of pain syndrome in patients receiving

Table 1. Main parameters of AGW therapy efficacy (mean±SEM)

Parameter	Patient group	Visit number						
		1	3	4	5	6	7	8
Rash intensity as evaluated by patient, scores	1	0.88±0.19	0.88±0.18	0.84±0.17	0.84±0.18	0.84±0.18	0.84±0.18	0.84±0.18
	2	0.72±0.19	0.60±0.18	0.52±0.17	0.60±0.18	0.60±0.18	0.60±0.18	0.60±0.18*
Itching and burning intensity in the vulva, scores	1	0.28±0.13	0.28±0.15	0.08±0.11	0.12±0.10	0.12±0.10	0.08±0.09	0.08±0.09*
	2	0.36±0.13	0.44±0.15	0.28±0.11	0.20±0.10	0.20±0.10	0.20±0.09	0.16±0.09
Decreasing of pain syndrome intensity, scores	1	0.08±0.10	0.08±0.09	0.08±0.06	0.08±0.06	0.08±0.06	0.08±0.06	0.16±0.08
	2	0.20±0.10	0.16±0.09	0.04±0.06	0.04±0.06	0.04±0.06	0.04±0.06	0.04±0.08*
Therapeutic efficacy evaluation (by patient), scores	1	–	3.00±0.12	2.84±0.13	2.84±0.12	2.84±0.15	2.84±0.18	2.84±0.18*
	2	–	2.84±0.12	2.64±0.13	2.72±0.12	2.64±0.15	2.40±0.18	2.40±0.18
Therapeutic efficacy evaluation (by doctor), scores	1	–	4.00±0.07	3.92±0.13	3.92±0.17	3.92±0.20	3.92±0.22	3.92±0.22
	2	–	3.68±0.07	3.28±0.13	3.24±0.17	3.12±0.20	3.00±0.22	3.00±0.22*
Rash area in the vulva, cm ²	1	2.30±0.16	2.30±0.16	2.24±0.18	2.24±0.20	2.24±0.20	2.24±0.20	2.25±0.20
	2	2.29±0.17	2.04±0.17	1.82±0.19	1.66±0.20	1.64±0.20	1.62±0.20	1.60±0.20*

Notes: there was no efficacy assessment on visit 2 (this visit was for randomization only); *statistically significant differences before (visit 1) and after (visit 8) treatment ($p < 0.05$). The data is expressed as M±SEM. Group 1 is for placebo, group 2 is for Wartocid.

Table 2. Complete Blood Count (CBC) and blood chemistry

Parameter	Groups			
	1 (placebo)		2 (imiquimod)	
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
CBC parameters				
Hb, mg/L	13.07±0.11	13.42±0.12	13.07±0.12	13.36±0.11
Erythrocytes, 10 ¹² /L	4.29±0.06	4.57±0.09	4.28±0.06	4.53±0.08
Leukocytes, 10 ⁹ /L	6.08±0.18	6.75±0.15	6.39±0.21	6.17±0.15
Platelets 10 ⁹ /L	267.40±8.67	309.40±9.09	260.80±8.34	297.80±10.54
ESR, mm/h	5.04±0.32	4.40±0.31	3.32±0.28	3.96±0.25
Blood chemistry				
ALT, u/L	14.07±0.86	13.12±0.96	13.34±0.97	12.51±0.90
AST, u/L	12.52±0.73	11.11±0.77	12.91±0.70	10.95±0.77
Total bilirubin, μmol/L	9.04±0.45	9.44±0.61	9.49±0.58	8.74±0.43
Creatinin, μmol/L	70.56±2.29	69.68±2.69	71.32±1.76	68.00±2.33
Glucose, mmol/L	4.95±0.10	5.15±0.08	4.71±0.10	5.0±0.08

Notes: ALT — alanine aminotransferase; AST — aspartate aminotransferase. The data is expressed as M±SEM.

Wartocid was due to reduction of AGW area, whereas the itch intensity remained at an elevated level due to the specific nature of the mechanism of activity of imiquimod causing a local pro-inflammatory reaction [1, 8, 21].

Since efficacious treatment of skin lesions of viral etiology reduces positive tests for viral DNA, particularly for HPV, all patients underwent qualitative evaluation for the presence of viral DNA using PCR upon completion of the trial. It was shown that placebo treated patients retained HPV DNA by PCR, as all samples taken from Group 1 remained positive. In contrast, 12% of Wartocid treated patients produced a negative reaction for HPV DNA, while the remaining test samples from Group 2 were positive (viral load was not determined). This is consistent with the literature data that treatment with imiquimod reduced the number of positive HPV DNA tests by 7–15% [8, 20].

The integral treatment efficacy assessment was significantly elevated for Wartocid. Namely, according to patients' assessment, a reduction in the size of rash areas after Wartocid therapy occurred 3.7 times more often than in patients receiving placebo. According to «improvement» estimation scale, the positive assessment of therapy efficacy in patients receiving Wartocid was observed 3 times more often than in the placebo group (36% and 12% respectively). The positive estimation of therapeutic efficacy assessed by a doctor was observed in 52% of patients

receiving Wartocid and only in 4% of patients receiving placebo. These results are in line with the results obtained when the brand product Aldara was used [9, 12, 19, 20, 22, 25].

One of the main tasks of the study was to evaluate the safety of Wartocid. For this purpose all patients from Groups 1 and 2 underwent CBC and blood chemistry testing before and right after treatment with either placebo or Wartocid (Table 2). As we found out, neither Wartocid nor placebo caused any significant deviation in blood parameters beyond the standards rate suggesting a similar safety profile of Wartocid compared to Aldara [8, 13].

In addition to this, the investigated drug was well-tolerated in patients. Adverse effects were rare and insignificant. Specifically, there were no adverse events and/or other unintended side effects with the exception of a slight increase in itch intensity in patients receiving Wartocid.

In summary, our study demonstrated comparable efficacy and safety profiles of Wartocid to the brand product Aldara in AGW treatment, since a clinical therapeutic effect was achieved in 52% of patients with AGW, of which 16% showed complete convalescence and 36% showed a reduction of the AGW area.

Acknowledgments

We wish to thank Zoran Panjak for his excellent technical assistance.

References

- Ahn C.S., Huang W.W. Imiquimod in the treatment of cutaneous warts: an evidence-based review. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2014, vol. 15, no. 5, pp. 387–399. doi: 10.1007/s40257-014-0093-5
- Assi R., Reddy V., Einarsdottir H., Longo W. Anorectal human papillomavirus: current concepts. *Yale J. Biol. Med.*, 2014, vol. 87, pp. 537–547.
- Averett D.R., Fletcher S.P., Li W., Webber S.E., Appleman J.R. The pharmacology of endosomal TLR agonists in viral disease. *Biochem. Soc. Transactions.*, 2007, vol. 35, pt. 6, pp. 1468–1472. doi: 10.1042/BST0351468
- Benevolo M., Doná M.G., Ravenda P.S., Chiocca S. Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, 2016, vol. 14, iss. 5, pp. 465–477. doi: 10.1586/14787210.2016.1174065

5. Beutner K.R., Ferenczy A. Therapeutic approaches to genital warts. *Am. J. Med.*, 1997, vol. 102, iss. 5A, pp. 28–37.
6. Gameiro A., Alves J., Santo I., Azevedo J. Condilomas anogenitais numa consulta de doenças sexualmente transmissíveis: Centro de Saúde da Lapa — Lisboa, 2008 a 2014. *Acta Med. Port.*, 2016, vol. 29, no. 2, pp. 101–106.
7. Chang Y.C., Madkan V., Cook-Norris R., Sra K., Tying S. Current and potential uses of imiquimod. *South Med. J.*, 2005, vol. 98, iss. 9, pp. 914–920. doi: 10.1097/01.smj.0000176712.01491.98
8. Glew S.S., Connor M.E., Snijders P.J.F., Stanbridge C.M., Buckley C.H., Walboomers J.M.M., Meijer C.J.L.M., Stern P.L. HLA expression in pre-invasive cervical neoplasia in relation to human papilloma virus infection. *Eur. J. Cancer*, 1993, vol. 29, iss. 14, pp. 1963–1970.
9. Grillo-Ardila C.F., Angel-Müller E., Salazar-Díaz L.C., Gaitán H.G., Ruiz-Parra A.I., Lethaby A. Imiquimod for anogenital warts in non-immunocompromised adults. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2014, iss. 11: CD010389. Doi: 10.1002/14651858.CD010389.pub2
10. Gross G. Therapy of human papillomavirus infection and associated epithelial tumors. *Intervirol.*, 1997, vol. 40, iss. 5–6, pp. 368–377.
11. Harrison L.I., Stoesz J.D., Battiste J.L., Nelson R.J., Zarraga I.E. A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. *J. Dermatol. Treat.*, 2009, vol. 20, no. 3, pp. 1–5.
12. Hengge U.R., Esser S., Schultewolter T., Behrendt C., Meyer T., Stockfleth E., Goos M. Self-administered topical 5% imiquimod for the treatment of common warts and molluscum contagiosum// Br. J. Dermatol., 2000, vol. 143, no. 5, pp. 1026–1031.
13. Hernández Quijano T., Illanes Aguiar B., Salas Linares N., Alarcón Romero Ldel C., Hernández Valencia M. [Assessment of the treatment with imiquimod in persistent infection by human papillomavirus with the polymerase chain reaction method]. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 2006, vol. 74, no. 6, pp. 317–326. [In Spanish]
14. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Melekhina L.E., Bogdanov E.V., Butareva M.M. Results of the analysis of activity of medical organizations dermatovenereological profile in the Russian Federation for 2012. *J. Dermatol. Venereol.*, 2013, vol. 5, pp. 21–39. [In Russ.]
15. Lucs A.V., DeVoti J.A., Hatam L., Afzal A., Abramson A.L., Steinberg B.M., Bonagura V.R. Immune dysregulation in patients persistently infected with Human papillomaviruses 6 and 11. *J. Clin. Med.*, 2015, vol. 4, no. 3, pp. 375–388.
16. Martel de C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.*, 2012, vol. 13, no. 6, pp. 607–615.
17. Meeuwis K.A., Hilbrands L.B., Int'Hout J., Slangen B.F., Hendriks I.M., Hinten F., Christiaans M.H., Quint W.G., Van de Kerkhof P.C., Massuger L.F., Hoitsma A.J., Van Rossum M.M., Melchers W.J., De Hullu J.A. Cervicovaginal HPV infection in female renal transplant recipients: an observational, self-sampling based, cohort study. *Am. J. Transplant.*, 2015, vol. 15, no. 3, pp. 723–733.
18. Nelson E.L., Stockdale C.K. Vulvar and vaginal HPV disease. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, vol. 40, iss. 2, pp. 359–376.
19. Park I.U., Introcaso C., Dunne E.F. Human papillomavirus and genital warts: a review of the evidence for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, vol. 61 (suppl. 8): S849–S855.
20. Park S.M., Kim G.W., Mun J.H., Song M., Kim H.S., Kim B.S., Kim M.B., Ko H.C. Fractional laser-assisted topical imiquimod 5% cream treatment for recalcitrant common warts in children: a pilot study. *Dermatol Surg.*, 2016, vol. 42, iss. 12, pp. 1340–1346. doi: 10.1097/DSS.0000000000000885
21. Patel H., Wagne M., Singhal P., Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infectious Diseases*, 2013, vol. 13: 39. doi: 10.1186/1471-2334-13-39
22. Perry C.M., Lamb H.M. Topical imiquimod: a review of its use in genital warts. *Drugs*, 1999, vol. 58, no. 2, pp. 375–390.
23. Reither M.J., Testerman T.L., Miller R.L., Weeks C.E., Tomai M.A. Cytokine induction in mice by the immunomodulatory Imiquimod. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, vol. 55, no. 2, pp. 234–240.
24. Schön M.P., Schön M. Imiquimod: mode of action. *Brit. J. Dermatol.*, 2007, 157 (suppl. 2), pp. 8–13.
25. Syed T.A., Hadi S.M., Qureshi Z.A., Ali S.M., Kwah M.S. Treatment of external genital warts in men with imiquimod 2% in cream. A placebo-controlled, double-blind study. *J. Infect.*, 2000, vol. 41, no. 2, pp. 148–151.
26. Ueyama A., Yamamoto M., Tsujii K. Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: a role for interferon- α in dendritic cell activation by imiquimod. *J. Dermatol.*, 2014, vol. 41, no. 2, pp. 135–143.
27. Wincle G., Osborn D.W. 1H-imidazo[4,5-c]quinolinamines and antiviral use. *US Patent No. 4 689 338. 1987.*

Авторы:

Смирнов В.С., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Петленко С.В., д.м.н., старший научный сотрудник, руководитель отдела клинических испытаний ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Савельев С.А., к.б.н., сотрудник отдела регистрации ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Редлих Г., генеральный и исполнительный директор компании «Имплицит Биосайнс», Брисбен, Австралия;
Стукань Н.И., сотрудник отдела клинических испытаний ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Smirnov V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, CJSC MBSIK "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation;
Petlenko S.V., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Department of Clinical Trials, CJSC MBSIK "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation;
Savelyev S.A., PhD (Biology), Officer of the Registration Department, CJSC MBSIK "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation;
Redlich G., CEO & Managing Director Implicid Bioscience LTD, Brisbane, Australia;
Stukan N.I., Officer of the Department of Clinical Trials, CJSC MBSIK "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.06.2017
 Отправлена на доработку 20.06.2017
 Принята к печати 27.06.2017

Received 05.06.2017
 Revision received 20.06.2017
 Accepted 27.06.2017

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

А.В. Лямин¹, Д.Д. Исмагуллин¹, А.В. Жестков¹, А.М. Ковалев²,
Л.А. Барышникова², С.С. Неняйкин¹

¹ Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия

² Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия

Резюме. В последнее время наблюдается значительный рост заболеваемости микобактериозами, который обусловлен увеличением доли иммуносупрессированных пациентов, наличием у них различных коморбидных состояний, а также совершенствованием методов диагностики. Выбор наиболее точного метода идентификации является крайне важным в определении тактики лечения пациентов. Цель исследования — провести сравнительный анализ современных методов идентификации НТМБ, выделенных из клинического материала в 2015 г. в Самарской области. В работе проводилась идентификация 78 штаммов микроорганизмов. Лабораторная диагностика проводилась с использованием метода ДНК-гибридизации и методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. **Результаты.** При идентификации микроорганизмов с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии было выделено 16 штаммов (20,5%) *M. kansasii*; по 11 штаммов (14,1%) *M. avium* и *M. fortuitum*; 9 штаммов (11,5%) *M. gordonae*; по 3 штамма (3,8%) *M. peregrinum*, *M. szulgai*, *M. chimera* intracellulare group, по 2 штамма (2,6%) *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. paragordoniae*, *M. senegalense*, по 1 штамму (1,3%) *M. chelonae*, *M. frederiksbergense*, *M. monacense*, *M. lentiflavum*. При использовании метода масс-спектрометрии было идентифицировано 15 видов НТМБ, методом ДНК-гибридизации — 9 видов. Полное совпадение результатов идентификации было отмечено всего у 45 (57,7%) штаммов, несовпадающие результаты выявлены у 16 штаммов (20,5%). Наиболее часто при использовании метода ДНК-гибридизации несовпадение было выявлено у медленно растущих культур (9 штаммов) с преобладанием микроорганизмов, идентифицированных как *M. gordonae*. Среди представителей быстрорастущих НТМБ было выявлено 7 расхождений в идентификации, более часто среди представителей групп *M. fortuitum* и *M. peregrinum*. Особое внимание стоит обратить на идентификацию штамма *M. kansasii* молекулярно-генетическим методом, который масс-спектрометрией был определен как *M. bovis*. Обе культуры *M. tuberculosis* complex, которые были идентифицированы при помощи MALDI-ToF спектрометрии, ДНК-гибридизацией не были определены до вида. 17 (21,8%) штаммов микроорганизмов, которые не были идентифицированы при использовании метода ДНК-гибридизации, идентифицированы с помощью спектрометрии, включая медленно растущие микроорганизмы, не относящиеся к микобактериям 7 штаммов (9,0%): *Gordonia rubriperticta*, *Nocardia forcinica*, *Tsukumurella* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*. Точная видовая идентификация НТМБ является основополагающей для определения тактики лечения пациентов с микобактериозами. Возможности идентификации нетуберкулезных микобактерий с использованием метода ДНК-гибридизации являются недостаточными на сегодняшний день. Внедрение новых методов, таких как MALDI-ToF спектрометрия, позволяет идентифицировать большее количество видов не-

Адрес для переписки:

Лямин Артем Викторович
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18.
Тел.: 8 (846) 260-33-61.
E-mail: avlyamin@rambler.ru

Contacts:

Artem V. Lyamin
443079, Russian Federaton, Samara, Gagarin str., 18.
Phone: +7 (846) 260-33-61.
E-mail: avlyamin@rambler.ru

Библиографическое описание:

Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Жестков А.В., Ковалев А.М., Барышникова Л.А., Неняйкин С.С. Сравнительный анализ методов идентификации нетуберкулезных микобактерий, выделенных из клинического материала // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 285–291. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-285-291

Citation:

Lyamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kovalyov A.M., Baryshnikova L.A., Nenajkin S.S. Comparative analysis of methods for identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical material // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 285–291. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-285-291

туберкулезных микобактерий, а также другие виды медленно растущих микроорганизмов, имеющих сходства с микобактериями по культуральным и морфологическим свойствам, что значительно повышает диагностические возможности лабораторий.

Ключевые слова: микобактериозы, нетуберкулезные микобактерии, ДНК-гибридизация, MALDI-ToF масс-спектрометрия, идентификация микроорганизмов.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL

Lyamin A.V.^a, Ismatullin D.D.^a, Zhestkov A.V.^a, Kovalyov A.M.^b, Baryshnikova L.A.^b, Nenjakkin S.S.^a

^a Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

^b Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary named N.V. Postnikov, Samara, Russian Federation

Abstract. Recently there has been a significant increase in the incidence of mycobacteriosis, which is due to an increase in the proportion of immunosuppressed patients, the presence of these various comorbid conditions, as well as the improvement of diagnostic methods. Selecting the most accurate method of identification is extremely important in determining treatment strategy of patients. The aim of the study was to conduct a comparative analysis of modern methods of identification NTMB isolated from clinical specimens in 2015 in the Samara region. The work was carried out identification of 78 strains of microorganisms. Laboratory diagnosis was carried out using the DNA hybridization method and MALDI-ToF mass spectrometry. When microbial identification using MALDI-ToF mass spectrometry was isolated 16 strains (20.5%) *M. kansasii*; 11 strains (14.1%) *M. avium* and *M. fortuitum*; 9 strains (11.5%) *M. gordonae*; strain 3 (3.8%) *M. peregrinum*, *M. szulgai*, *M. chimera* intracellulare group, strain 2 (2.6%) *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. paragordoniae*, *M. senegalense*, 1 strain (1.3%) *M. chelonae*, *M. frederiksbergense*, *M. monacense*, *M. lentiflavum*. By using mass spectrometry, it was identified 15 types NTMB compared with 9 types — by DNA hybridization. Full match identification results was observed only in 45 (57.7%) strains of divergent strains were found in 16 (20.5%). Most often when using the DNA hybridization method, discrepancy was detected in slow-growing cultures (9 strains) with a predominance of microorganisms identified as *M. gordonae*. Among the representatives of fast-growing NTMB, seven investigations were identified in the identification, more often among representatives of the *M. fortuitum* and *M. peregrinum* groups. Particular attention should be paid to the identification of the *M. kansasii* strain by a molecular genetic method, which mass spectrometry was defined as *M. bovis*. Both cultures of *M. tuberculosis* complex, which were identified by MALDI-ToF spectrometry, DNA hybridization were not determined to species. 17 (21.8%) of microbial strains which have been identified using the method of DNA hybridization, identified by spectrometry, including slow-growing microorganisms, non-mycobacteria strains seven (9.0%): *Gordonia rubriperticta*, *Nocardia forcinica*, *Tsukumurella* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*. Accurate species identification NTMB is fundamental to determine the tactics of treatment of patients with mycobacteriosis. Due to this rather limited possibility of identification of non-tuberculous mycobacteria, using a DNA-hybridization method is inadequate to date. The introduction of new techniques, such as MALDI-ToF spectrometry, can identify a greater number of species of nontuberculous mycobacteria, as well as other types of slow-growing microorganisms having similarities with mycobacteria on cultural and morphological properties, which significantly increases the diagnostic capabilities of laboratories.

Key words: mycobacteriosis, nontuberculous mycobacteria, DNA-hybridization method, MALDI-ToF mass spectrometry, microorganisms identification.

Введение

Микобактериозы — группа заболеваний различной локализации, в развитии которых главным этиологическим фактором являются нетуберкулезные микобактерии (НТМБ). В связи с трудностями выделения и идентификации данной группы микроорганизмов, отсутствием данных о потенциальном клиническом значении некоторых из них, ростом заболеваемости туберкулезом, довольно долгое время интерес к данной группе микроорганизмов среди микробиологов был значительно ограничен. Однако с накоплением достаточного количества данных о патогенетическом действии НТМБ в последние десятилетия проблема этиологической диагностики микобактериозов вновь начала приобретать серьезную актуальность.

Во всех развитых странах отмечается значительный рост заболеваемости микобактериозами. Это обусловлено в первую очередь внедрением в практику совершенно новых методов диагностики, также это связано с различными неинфекционными иммуносупрессивными состояниями пациентов — после системной глюкокортикоидной и цитостатической терапии, лечением противоопухолевыми препаратами, широким распространением вторичных и первичных иммунодефицитов, которые могут являться главными факторами риска инфицирования НТМБ. Не менее важной причиной является подъем заболеваемости ВИЧ-инфекцией, с которым параллельно было отмечено наибольшее число случаев смертности от генерализованных форм инфекций, вызываемых НТМБ [7].

К сожалению, в Российской Федерации практически отсутствуют статистические данные о распространенности микобактериозов, отсутствует современная клиническая классификация, данные о видовой структуре НТМБ, особенностях эпидемиологии. Значительной проблемой является отсутствие нормативных документов, регламентирующих основные этапы проведения лабораторной диагностики данной группы заболеваний [5]. Тем не менее, в отечественной литературе все чаще стали публиковаться данные о генерализованных формах микобактериозов с летальными исходами [1, 2, 3, 4].

Кроме потенциальной клинической значимости и роста заболеваемости микобактериозами важную роль в актуализации проблемы играет совершенствование методов диагностики. Появление высокоспецифичных и чувствительных методов выделения и идентификации НТМБ (культивирование в автоматизированных системах с использованием жидких питательных сред, молекулярно-генетические методы и метод MALDI-ToF масс-спектрометрии) позволило существенно ускорить диагностику микобактериозов и повысить ее эффективность [7, 10].

Классическая видовая идентификация НТМБ в микробиологической практике долгое время имела значительные ограничения, связанные с метаболическими, генетическими, культуральными и широким рядом других особенностей. В современной лабораторной диагностике микобактериозов используются метод ДНК-гибридизации, предложенный «Hain Lifescience» (Германия) и рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения в 2008 г. как основной метод идентификации НТМБ. Технология основана на принципе обратной гибридизации продукта ПЦР с видоспецифичными зондами, иммобилизованными на ДНК-стрипах. Для НТМБ разработаны два набора для ступенчатой идентификации, позволяющие определить до 28 видов НТМБ. Стоит отметить, что преимуществами данной методики являются достаточно высокая скорость и точность идентификации [9]. Основным недостатком этого метода исследования являются высокая себестоимость наборов реагентов, а соответственно и одного анализа.

В настоящее время известно довольно высокое разнообразие возбудителей микобактериозов, их насчитывается более 200 постоянно обитающих в окружающей среде видов, из которых около 50 являются возможными этиологическими факторами заболеваний человека различной локализации [6]. Данный факт свидетельствует о том, что ДНК-гибридизация для идентификации НТМБ, позволяющая определить 28 видов, на сегодняшний день является недостаточной. Решением этой проблемы, стало внедрение в лабораторную практику современного метода

масс-спектрометрии, который осуществляется с помощью MALDI-ToF масс-спектрометра с соответствующим программным обеспечением. Значительным преимуществом данного метода является наличие базы данных с различными спектрами, которая позволяет идентифицировать более 160 видов НТМБ на базе масс-спектрометра стандартной комплектации при использовании соответствующей библиотеки спектров, а также низкая себестоимость одного анализа.

В специализированных лабораториях противотуберкулезной службы, направленных на научную деятельность, используется молекулярно-генетическая идентификация микобактерий по гену 16S рРНК, который обладает высокой консервативностью [11]. Результаты секвенирования последовательности 16S рРНК позволяют проводить идентификацию уже известных НТМБ и могут использоваться для регистрации новых видов.

Помимо описанных выше методик, в решении проблемы видовой дифференциации нашло применение мультилокусное секвенирование. Данный анализ заключается в секвенировании определенного набора генов. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» или сиквенс-типом по выбранным локусам. Метод позволяет идентифицировать бактерии до подвида, однако данный анализ довольно тяжело внедрить в рутинную лабораторную диагностику в связи с трудоемкостью и высокой стоимостью [8].

Следует отметить, что методы, основанные на секвенировании широко используются в высокоспециализированных микробиологических лабораториях, при этом на идентификацию требуется большое количество времени и средств, что является существенным недостатком для рутинной лабораторной диагностики. Таким образом, оптимальным для микробиологической практики остаются методы, основанные на ДНК-гибридизации и масс-спектрометрии.

Целью исследования является сравнительный анализ идентификации НТМБ, выделенных из клинического материала в 2015 г. в Самарской области, методом ДНК-гибридизации и масс-спектрометрии.

Материалы и методы

В исследовании проводилась идентификация 78 штаммов микроорганизмов, выделенных из клинического материала в 2015 г. Критерием включения штаммов в исследование являлось соответствие культуральных свойств и сроков появления роста на плотных и жидких питательных средах НТМБ. Клинический материал, из которого были выделены культуры, представлен мокротой — 74 образца, мочой — 1 образец, промывными водами бронхов — 2 образца, про-

мывными водами желудка — 1 образец. Штаммы были выделены в бактериологической лаборатории ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова.

Процедуры идентификации НТМБ с использованием методики ДНК-гибридизации проводились также на базе лаборатории ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова. Дополнительно экстрагировали белки выросших микроорганизмов для проведения идентификации с использованием масс-спектрометра. Идентификацию проводили на приборе Microflex LT® на базе микробиологического отдела клиничко-диагностической лаборатории клиник ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Принцип метода ДНК-гибридизации заключается в том, что на ДНК-стрипах нанесены специфические пробы, которые комплементарны амплифицируемым нуклеиновым кислотам (ампликонам). После денатурации одноцепочечные ампликоны специфически связываются с пробами на стрипах (этап гибридизации) и затем визуализируются в последовательной энзиматической реакции (со стрептавидином и щелочной фосфатазой). Детекция микобактерий выполняется путем сравнения результатов гибридизации с шаблонами.

На базе противотуберкулезного диспансера проводились процедуры пробоподготовки культур микобактерий для идентификации с использованием масс-спектрометра, включающие этапы инактивации и экстракции белков НТМБ по методике, рекомендованной Bruker Daltonic GmbH (Германия).

Таблица 1. Молекулярно-генетическая идентификация НТМБ

Table 1. Molecular-genetic identification of NTMB

Выделенная культура НТМБ Selected culture of NMTB	Количество штаммов Number of strains
<i>Mycobacterium</i> spp.	11
<i>M. fortuitum</i>	15
<i>M. kansasii</i>	14
<i>M. avium</i>	13
<i>M. gordonae</i>	12
<i>M. abscessus</i>	2
<i>M. intracellulare</i>	2
<i>M. celatum</i>	1
<i>M. peregrinum</i>	1
<i>M. chelonae</i>	1
Не идентифицировано (High GC GR+) Not identified	4
Не идентифицировано Not identified	2

В работе использовались биомассы микобактерии, выращенные на питательной среде Левенштейна–Йенсена. Процедуры выделения белков для идентификации включали несколько этапов. Первый этап — инактивация НТМБ, помещенных в пробирку с водой. Далее биомассы микобактерий кипятили в твердотельном термостате при температуре 96°C в течении 30 мин. Второй этап — добавление этанола и последующее осаждение биомассы микобактерий, с помощью настольной центрифуги в течении 2 мин на максимальной скорости (13 000 об/мин). Супернатант удалялся дозатором, полученный осадок высушивался при комнатной температуре. Третий этап — экстракция белков с добавлением циркониевокремниевых шариков, чистого ацетонитрила с последующим вортексированием в течение 1 мин. Далее добавлялся 70% раствор муравьиной кислоты с последующим центрифугированием на максимальной скорости в течении 2 мин. Полученный супернатант наносился на металлическую мишень и после высыхания покрывался стандартным раствором матрицы НССА (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота). В качестве стандарта калибровки использовался коммерческий препарат DN5-Alfa *E. coli* (Bruker bacteria test standart).

Результаты

Выделение и идентификация микобактерий лабораториями противотуберкулезных диспансеров в большинстве своем проходит с помощью метода ДНК-гибридизации как стандартного, рекомендованного ВОЗ, метода.

При идентификации данным методом были получены результаты, приведенные в таблице 1.

Преобладающей группой оказались представители медленно растущих НТМБ, среди которых было выделено 42 штамма (53,8%). При анализе НТМБ по способности выделять пигмент наибольшее количество составили нефотохромогенные культуры — 16 штаммов (38,1% от общего количества медленно растущих НТМБ), основным представителем этой группы является *M. avium* (13 штаммов). Фотохромогенные НТМБ были выделены в 14 случаях (33,3% от общего количества медленно растущих НТМБ) и были представлены *M. kansasii*; среди скотохромогенных НТМБ было выделено 12 штаммов *M. gordonae* (28,6% от общего количества медленно растущих НТМБ). Быстрорастущих НТМБ было выделено 19 штаммов (24,4%). Основным представителем оказалась *M. fortuitum* — 15 штаммов.

Молекулярно-генетическим методом не удалось идентифицировать до вида некоторых представителей рода *Mycobacterium* — 11 штаммов (14,1%). 6 культур, выросших на среде Левенштейна–Йенсена не были идентифицированы, 4 из них были определены как грамположи-

тельные бактерии с высоким содержанием гуанина и цитозина в геноме. Количество неидентифицированных до вида культур составило 21,7% (17 штаммов). Также следует отметить, что из 78 штаммов, включенных в исследование, методом ДНК-гибридизации было идентифицировано всего 9 видов микобактерий.

По результатам MALDI-ToF масс-спектрометрии видовая идентификация расценивалась нами при значениях индекса Score более 2.

Идентификация анализируемых культур при помощи метода масс-спектрометрии, показала следующие результаты, приведенные в таблице 2.

При анализе результатов идентификации методом масс-спектрометрии преобладающей группой также оказались медленнорастущие НТМБ — 45 штаммов (57,7%). При этом наибольшее количество составили нефотохромогенные культуры — 18 штаммов (40,0%); основные представители данной группы также относились к виду *M. avium* (11 штаммов). Фотохромогенные НТМБ были выделены в 16 (35,6%) случаях и были представлены *M. kansasii*. Было выделено 11 штаммов скотохромогенных НТМБ (28,6%), представленных *M. gordonae* и *M. paragordoniae*. Группа быстрорастущих НТМБ составила 21 штамм (26,9%), основные представители *M. fortuitum* и *M. peregrinum* в общем количестве 14 штаммов. Представители видов *M. frederiksbergense* и *M. lentiflavum* по современной классификации занимают промежуточное значение между медленно- и быстрорастущими НТМБ, и были выделены в одном случае.

Помимо НТМБ среди культур, выбранных для исследования, с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии были идентифицированы медленнорастущие микроорганизмы, не относящиеся к микобактериям: *Gordonia rubriperticta*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Nocardia forcinica*, *Tsukumurella* spp., *Corynebacterium amycolatum* и *Rhodotorula mucilaginosa*, имеющие потенциальное клиническое значение. Общее количество таких культур составило 7 штаммов (9,0%). Основную часть приведенных микроорганизмов невозможно идентифицировать рутинными методами идентификации. Представители нокардий имеют разную степень кислотоустойчивости, что затрудняет определение их родовой и видовой принадлежности, при этом по клинической картине поражения органов дыхания нокардиозы схожи с туберкулезным процессом. *R. mucilaginosa* относится к условно-патогенным грибам, способным расти на средах, которые применяют для культивирования микобактерий, и может вызывать патологические процессы в легочной ткани.

При сравнительном анализе методов ДНК-гибридизации и масс-спектрометрии полное совпадение результатов видовой идентификации отмечено у 45 (57,7%) штаммов *M. kansasii*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* и *M. abscessus*.

Таблица 2. Результаты идентификации микроорганизмов с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии

Table 2. Results of identification of microorganisms using MALDI-ToF mass spectrometry

Выделенная культура НТМБ Selected culture of NMTB	Количество штаммов Number of strains
<i>M. kansasii</i>	16
<i>M. avium</i>	11
<i>M. fortuitum</i>	11
<i>M. gordonae</i>	9
<i>M. peregrinum</i>	3
<i>M. szulgai</i>	3
<i>M. chimera intracellulare</i> group	3
<i>M. abscessus</i>	2
<i>M. septicum</i>	2
<i>M. paragordoniae</i>	2
<i>M. senegalense</i>	2
<i>M. chelonae</i>	1
<i>M. frederiksbergense</i>	1
<i>M. monacense</i>	1
<i>M. lentiflavum</i>	1
<i>M. tuberculosis complex</i>	2
<i>M. bovis</i>	1
<i>Gordonia rubriperticta</i>	1
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1
<i>Nocardia forcinica</i>	2
<i>Tsukumurella</i> spp.	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1

Согласно нашим данным несовпадающие результаты двух анализируемых в работе методов обнаружены у 16 штаммов (20,5%). 17 штаммов микроорганизмов, у которых не был определен вид при использовании ДНК-гибридизации, были идентифицированы с помощью MALDI-ToF спектрометрии. Полученные данные по идентификации НТМБ приведены в таблице 3.

Обсуждение

При описании групп НТМБ, выделенных в исследовании, использовалась классификация, предложенная в 1954 г. А. Timple и Е. Runyon, которая наиболее широко применяется в настоящее время. Согласно этой классификации, НТМБ делятся на группы по скорости роста, культуральным свойствам и способности к пигментообразованию. К первым трем группам относятся медленнорастущие НТМБ, подразделяющиеся на фотохромогенные, скотохромогенные, нефотохромогенные; четвертая группа — быстрорастущие микобактерии. Преобладающей группой микобактерий при исследовании обоими методами оказались медленнорастущие НТМБ.

Таблица 3. Сравнительный анализ методов идентификации НТМБ

Table 3. Comparative analysis of NTMB identification methods

ДНК-гибридизация DNA hybridization	MALDI-ToF масс-спектрометрия MALDI-ToF mass spectrometry
Идентифицированная культура Identified culture	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordoniae</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordoniae</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. senegalence</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. chimera intracellulare group</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. senegalence</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. kansassi</i>
<i>M. kansassi</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimera intracellulare group</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimera intracellulare group</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. peregrinum</i>

Однако видовой состав микобактерий, идентифицированных масс-спектрометрическим методом и ДНК-гибридизацией, различался как среди медленно-, так и среди быстрорастущих НТМБ.

Следует отметить, что в результате исследования масс-спектрометрическим методом все штаммы микроорганизмов были идентифицированы до конкретного вида (в 5 случаях — до группы или комплекса). В общей сложности определяемых этим методом НТМБ было 15 видов по сравнению с 9 видами, идентифицированными методом ДНК-гибридизации. Особо следует отметить, что 3 культуры были идентифицированы как *M. tuberculosis complex*, среди которых идентифицирован один штамм *M. bovis*.

Наиболее часто при использовании метода ДНК-гибридизации несовпадение было выявлено у медленно растущих культур (9 штаммов) с преобладанием микроорганизмов, иденти-

фицированных как *M. gordonae*. Среди представителей быстрорастущих НТМБ было выявлено 7 расхождений в идентификации, более часто среди представителей групп *M. fortuitum* и *M. peregrinum*. Особое внимание стоит обратить на идентификацию штамма *M. kansassii* молекулярно-генетическим методом, который масс-спектрометрией был определен как *M. bovis*. Обе культуры *M. tuberculosis complex*, которые были идентифицированы при помощи MALDI-ToF спектрометрии, ДНК-гибридизацией не были определены до вида.

В связи с ростом заболеваемости микобактериозами, внедрение новых высокоточных методов исследования является принципиально важным с точки зрения постановки правильного и точного диагноза. В первую очередь нужно учитывать, что главным критерием при постановке микобактериоза следует считать выделение чистой культуры НТМБ, ее идентификацию до вида и определение резистентности к антимикробным химиопрепаратам.

Лабораторная идентификация НТМБ является основополагающей для определения тактики лечения пациентов с микобактериозами, так как у медленно- и быстрорастущих микобактерий имеются выраженные различия в природной и приобретенной устойчивости к антимикробным препаратам. В связи с этим возможность идентифицировать с использованием метода ДНК-гибридизации только 28 видов НТМБ является недостаточной в современных условиях диагностики. Из 200 известных видов НТМБ более 50 имеют доказанное клиническое значение и требуют более детальной идентификации.

Внедрение новых методов, таких как MALDI-ToF спектрометрия, позволяет идентифицировать более 160 видов НТМБ, а также другие виды медленно растущих микроорганизмов, имеющих сходство с микобактериями по культуральным и морфологическим свойствам, что значительно повышает диагностические возможности лабораторий. Развитие микробиологической диагностики микобактериозов в Российской Федерации является одним из приоритетных направлений современной бактериологии и требует разработки нормативной базы для проведения идентификации НТМБ в лабораториях различного уровня.

Список литературы/References

- Бердников, Р.Б., Гринберг Л.М., Евсеев А.Ю. Летальный случай генерализованного микобактериоза у больного с терминальной стадией ВИЧ-инфекции // Туберкулез и болезни легких. 2016. Т. 94, № 4. С. 57–62. [Berdnikov R.B., Grinberg L.M., Evseev A.Yu. The lethal case of generalized mycobacteriosis in the patient at the terminal stage of HIV-infection. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease*, 2016, no. 4, pp. 47–62. doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-4-57-64 (In Russ.)]
- Майская, М.Ю., Оттен Т.Ф., Ариэль Б.М. Формы легочного и генерализованного микобактериоза при ВИЧ-инфекции в морфологическом освещении // Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2014. № 1–2. С. 21–25. [Maiskaya M.Yu., Otten T.F., Ariel B.M. Pulmonary and generalized forms of mycobacteriosis in HIV infection in the morphological aspect. *Tuberkulez i sotsial'no-znachimye zabolvaniya = Tuberculosis and Socially Significant Diseases*, 2014, no. 1–2, pp. 21–25 (In Russ.)]

3. Михайловский, А.М., Чуркин С.А., Пашкова Н.А., Лепеха Л.Н. Первый случай посмертной диагностики генерализованного нетуберкулезного микобактериоза у больной на поздней стадии ВИЧ-инфекции в Оренбургской области // Вестник современной клинической медицины. 2016. Т. 9, № 5. С. 88–93. [Mihajlovskij A.M., Churkin S.A., Pashkova N.A., Lepeha L.N. The first case of post-mortem diagnosis of generalized non-tuberculosis mycobacteriosis in a patient with advanced HIV infection in the Orenburg region. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = Herald of Modern Clinical Medicine*, 2016, no. 5, pp. 88–93. doi: 10.20969/VSKM.2016.9(5).88-93 (In Russ.)]
4. Оттен Т.Ф., Фоменкова Н.В., Майская М.Ю. Генерализованный микобактериоз у пациента с ВИЧ-инфекцией на стадии СПИДа // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 8. С. 57–62. [Otten T.F., Fomenkova N.V., Majskaja M.Ju. Generalised mycobacteriosis in a patient with HIV infection with AIDS. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease*, 2015, no. 8, pp. 57–62 (In Russ.)]
5. Чучалин А.Г. Респираторная медицина. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. Т. 1. 800 с. [Chuchalin A.G. Respiratornaya medicina [Respiratory medicine]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007, vol. 1, 800 p.]
6. Daley C.L., Griffith D.E. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2010, vol. 14, no. 6, pp. 665–671. doi: 10.4046/trd.2014.77.1.1
7. Jorgensen J.H., Carroll K.C., Funke G., Landry M.L., Richter S.S., Warnock D.W. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed., vol. 1, pp. 536–570. doi: 10.1128/9781555817381
8. Hall L., Doerr K.A., Wohlfiel S.L., Roberts G.D. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, no. 41, pp. 1447–1453.
9. Lee A.S., Jelfs P., Sintchenko V., Gilbert G.L. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J. Med Microbiol.*, 2009, no. 58, pp. 900–904. doi: 10.1099/jmm.0.007484-0
10. Springer B., Stockman L., Tescher K., Roberts G.D., Böttger E.C. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic method. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, no. 34, pp. 296–303.
11. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *J. Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, no. 2, pp. 319–354. doi: 10.1128/CMR.16.2.319-354.2003

Авторы:

Лямин А.В., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Исматуллин Д.Д., студент 6 курса медико-профилактического факультета ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Жестков А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Ковалев А.М., к.б.н., биолог бактериологической лаборатории ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия;

Барышникова Л.А., д.м.н., заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия;

Неняйкин С.С., зав. отделением инфекционной безопасности и гигиены Клиник ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Lyamin A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Ismatullin D.D., 6th year student of the Faculty of Medicine and Prevention, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Zhestkov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Kovalyov A.M., PhD (Biology), Biologist, Bacteriological Laboratory, N.V. Postnikov Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russian Federation;

Baryshnikova L.A., PhD, MD (Medicine), Deputy Chief Physician, N.V. Postnikov Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russian Federation;

Nenjajkin S.S., Head of the Department of Infectious Safety and Hygiene, Samara State Medical University Clinics, Samara, Russian Federation.

СРАВНЕНИЕ ГЕНОМОВ ВИРУСОВ ГРИППА А(H1N1)pdm09, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУССОДЕРЖАЩЕГО МАТЕРИАЛА

А.В. Фадеев, И.Н. Жилинская

ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В данной работе проведено сравнение генетических последовательностей вирусов гриппа, секвенированных из клинических образцов (носоглоточных мазков) и изолятов, выделенных на клетках линии MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах. В ходе исследования были получены данные о том, что 1–2-кратное пассирование вирусов гриппа в клетках MDCK не приводит к возникновению дополнительных мутаций в геноме вируса гриппа, и генетический материал этого вируса идентичен генетическому материалу из клинического образца. При пассировании вирусов в куриных эмбрионах в течение 1–2 пассажей генетический материал вируса отличается от генетического материала из клинического образца, так как появляются мутации в рецепторной области гемагглютинаина, приводящие к замене аминокислот (Q223R). Мутация Q223R меняет рецепторную специфичность гемагглютинаина с рецепторов человеческого типа (α -2,6-сиаловые кислоты) на рецепторы птичьего типа (α -2,3-сиаловые кислоты). Полученные данные совпадают с данными японских исследователей, показавших, что аналогичная замена в гене гемагглютинаина выявлена у японских штаммов вируса гриппа подтипа А(H1N1)pdm09, пассируемых в куриных эмбрионах в течение 1–2 пассажей. При дальнейшем их пассировании в куриных эмбрионах количество приобретенных адаптационных мутаций в поверхностных антигенах этих вирусов увеличивается. Таким образом, нами показано, что для генетического анализа эпидемически актуальных штаммов вирусов гриппа для рутинных задач эпидемиологического надзора использование прямого секвенирования клинических образцов, содержащих генетический материал вирусов, дает возможность получить наиболее достоверные данные, повысить их оперативность, поскольку позволяет сэкономить время, обычно затрачиваемое на вирусывыделение. В случае, если необходимо провести предварительное выделение вирусов, например, при отсутствии возможности провести полногеномную амплификацию из клинического образца (низкое содержание материала, присутствие ингибиторов полимеразной цепной реакции), оптимальным является вирусывыделение на клетках линии MDCK с минимальным количеством пассажей, что и используется в практике эпидемиологического надзора.

Ключевые слова: вирус гриппа А, полногеномное секвенирование, эпидемиологический надзор, гемагглютинин, адаптационные мутации, рецепторная специфичность.

COMPARISON OF INFLUENZA A(H1N1)pdm09 GENOMES OBTAINED FROM DIFFERENT TYPES OF VIRUS-CONTAINING MATERIAL

Fadeev A.V., Zhilinskaya I.N.

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. This paper describes results of comparison of genetic sequences of influenza viruses obtained from clinical samples (nasopharyngeal swabs) and viruses isolated on MDCK cells and in developing chick embryos. The obtained data

Адрес для переписки:

Фадеев Артем Викторович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова,
15/17, ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ.
Тел.: 8 (812) 499-15-20 (служебн.).
E-mail: artem.fadeev@influenza.spb.ru

Библиографическое описание:

Фадеев А.В., Жилинская И.Н. Сравнение геномов вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, полученных из различных типов вирусосодержащего материала // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 292–296.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-292-296

© Фадеев А.В., Жилинская И.Н., 2017

Contacts:

Artem V. Fadeev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova str.,
15/17, Research Institute of Influenza.
Phone: +7 (812) 499-15-20 (office).
E-mail: artem.fadeev@influenza.spb.ru

Citation:

Fadeev A.V., Zhilinskaya I.N. Comparison of Influenza A(H1N1)pdm09 genomes obtained from different types of virus-containing material // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 292–296. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-292-296

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2017-3-292-296>

shows that 1–2x fold passaging of influenza viruses in MDCK cells does not lead to additional mutations in the genome of the influenza virus, and the genetic material of this virus is identical to the genetic material from the clinical sample. When passaging viruses in chick embryos within 1–2 passages, the genetic material of the virus differs from the genetic material from the clinical sample, because of mutations in the receptor region of hemagglutinin, leading to aminoacid substitution Q223R. The mutation Q223R changes the receptor specificity of hemagglutinin from human-type receptors (α -2.6-sialic acids) to avian receptors (α -2.3-sialic acids). The data obtained coincide with the data of Japanese researchers who showed that a similar substitution in the hemagglutinin gene was detected in Japanese strains of influenza virus subtype A (H1N1) pdm09, passaged in chick embryos for 1–2 passages. With their further passaging in chick embryos, the number of acquired mutations in the surface proteins of these viruses increases. Thus, we have shown that for the genetic analysis of epidemic-relevant strains of influenza viruses for routine epidemiological surveillance tasks, the use of direct sequencing of clinical samples containing the genetic material of viruses makes it possible to obtain the most reliable data, to increase their efficiency, since it saves time normally spent on virus isolation procedure. If preliminary isolation of viruses is necessary, for example, if it is not possible to carry out full genome amplification from a clinical sample (low content of the material, presence of polymerase chain reaction inhibitors), virus isolation on MDCK cells with a minimal amount of passage is optimal, which is used in practice of epidemiological surveillance.

Key words: *Influenza A virus, whole-genome sequencing, epidemiological surveillance, hemagglutinin, adaptation mutations, receptor specificity.*

Введение

Широкое внедрение методов секвенирования нового поколения в исследования генетических свойств вирусов гриппа позволяет значительно повысить производительность метода генетического анализа вирусов гриппа, а использование прямого анализа генетического материала клинических образцов вирусов гриппа открывает путь к изучению возбудителя, геном которого не несет следов адаптации к системе выделения. Кроме того, прямой генетический анализ клинических образцов без промежуточной стадии вирусывыделения позволяет повысить экономическую эффективность работы за счет отказа от трудоемких и сложных для автоматизации методов. Однако применение этих методов для этиологического надзора за циркулирующими в человеческой популяции сезонными подтипами вирусов гриппа А ставит задачу оценить равнозначность данных молекулярно-генетического анализа, полученных от первичных образцов и вирусных изолятов, выделенных на традиционных системах изоляции.

С этой целью нами проведено сравнительное исследование генетической структуры вирусов гриппа А подтипа H1N1pdm09, в клинических образцах, полученных в Санкт-Петербурге и после выделения вирусов на клетках MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах.

Материалы и методы

Исследованные вирусы. Для молекулярно-генетического анализа были использованы носоглоточные смывы от больных с ПЦР-подтвержденным гриппом А(H1N1)pdm09, полученные в Санкт-Петербурге в течение эпидемического сезона 2015–2016 гг., а также

изоляты, полученные из соответствующих первичных образцов пассированием на клетках MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах в Лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России (табл. 1).

Выделение РНК. Выделение вирусной РНК из носоглоточных мазков, надосадочной культуральной жидкости и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов проводили с использованием набора реагентов Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полногеномная амплификация генетического материала вирусов гриппа А. Полногеномную амплификацию генетического материала исследуемых вирусов проводили методом одноступенчатой обратной транскрипции–полимеразной цепной реакции с использованием набора реагентов SuperScript III High Fidelity RT-PCR kit (Life Technologies, США) в соответствии с протоколом Жоу и соавт. [3].

Очистка продуктов полногеномной ПЦР. Выделение продуктов полногеномной ПЦР из ПЦР-смеси проводили с использованием набора реагентов Qiagen Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Германия).

Определение концентрации двуцепочечной кДНК. Концентрацию двуцепочечной кДНК в продуктах полногеномной ПЦР определяли с использованием спектрофлуориметра Qubit и набора реагентов Qubit HS dsDNA kit (Life Technologies, США).

Подготовка кДНК для секвенирования. Очищенная кДНК была разведена до концентрации 0,2 нг/мкл, после чего использована для приготовления библиотеки с набором реагентов Illumina Nextera XT (Illumina, США). Для индексирования образцов был использован набор Illumina Nextera XT Index kit v2 Set A (Illumina, США).

Таблица 1. Обозначения исследуемых вирусов

Table 1. Designations of analyzed viruses

Вирусы гриппа, анализируемые в клиническом образце (носоглоточные смывы) Influenza viruses analyzed in clinical samples (nasopharyngeal swabs)	Вирусы гриппа, выделенные на клетках линии MDCK Influenza viruses isolated in MDCK cells	Вирусы гриппа, выделенные на куриных эмбрионах Influenza viruses isolated in chicken embryos
A/Saint-Petersburg/RII362S/2015 (SPB362S)	A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (C1) (SPB3 C1)	A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (E2) (SPB3 E2)
A/Saint-Petersburg/RII425S/2015 (SPB425S)	A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (C1) (SPB7 C1)	A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (E1) (SPB7 E1)
A/Saint-Petersburg/RII812S/2016 (SPB812S)	A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (C1) (SPB48 C1)	A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (E2) (SPB48 E2)
A/Saint-Petersburg/RII869S/2016 (SPB869S)	A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (C2) (SPB51 C2)	A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (E2) (SPB51 E2)

Примечание: к названиям штаммов, выделенных из первичных образцов на культуре клеток MDCK, добавлены буква «С» и число пассажей (1 или 2), а к названиям штаммов, выделенных из первичных образцов на куриных эмбрионах, добавлены буква «Е» и число пассажей (1 или 2).
Note: names of isolated strains contain additional information: symbol “C” for strains isolated in MDCK cell culture, symbol “E” for strains isolated in chicken embryos and number of passages (1 or 2).

Секвенирование. Определение генетических последовательностей проводилось на секвенаторе Illumina MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов Illumina MiSeq Reagent kit v3 600 cycle.

Анализ результатов секвенирования нового поколения. Для оценки результатов секвенирования нового поколения, извлечения консенсусных последовательностей и оценки гетерогенности вирусных популяций использовалось программное обеспечение Iterative Refinement Meta-Assembler [2].

Результаты и обсуждение

В ходе исследования были получены полные геномы исследуемых вирусов гриппа А из 4 носоглоточных смывов от больных (первичные образцы) и 8 вирусных изолятов, получен-

ных из соответствующих первичных образцов на двух различных системах выделения — клетках линии MDCK и развивающихся куриных эмбрионах. Данные секвенирования опубликованы в международной базе данных GISAID (табл. 2).

При сравнении полученных консенсусных последовательностей сегментов генома вирусов из клинических образцов с последовательностями вирусов, изолированных на клетках MDCK и в куриных эмбрионах, были выявлены нуклеотидные замены в пяти сегментах: HA, NA, PB1, PA и NP (табл. 3).

Замены нуклеотидов в сегментах PB1 (C1278T), PA (T1956A) и NP (C153T) оказались синонимичными.

В структуре генов HA и NA замены нуклеотидов приводили к замене аминокислот. Так,

Таблица 2. Номера изолятов в базе данных GISAID

Table 2. Isolate numbers in GISAID database

Название вируса Virus name	Номер изолята в базе данных GISAID Isolate number in GISAID database
A/Saint-Petersburg/RII362S/2015	EPI_ISL_234031
A/Saint-Petersburg/RII425S/2015	EPI_ISL_207556
A/Saint-Petersburg/RII812S/2016	EPI_ISL_207567
A/Saint-Petersburg/RII869S/2016	EPI_ISL_207571
A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (C1)	EPI_ISL_207546
A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (C1)	EPI_ISL_207550
A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (C1)	EPI_ISL_234014
A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (C2)	EPI_ISL_234015
A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (E2)	EPI_ISL_234020
A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (E1)	EPI_ISL_234021
A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (E2)	EPI_ISL_234023
A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (E2)	EPI_ISL_234031

Таблица 3. Нуклеотидные замены в сегментах генома исследованных вирусов

Table 3. Nucleotide substitutions in genome segments of analyzed viruses

Сегмент, позиция Segment, position	SPB362S	SPB3 C1	SPB3 E2	SPB425S	SPB7 C1	SPB7 E2	SPB812S	SPB48 C1	SPB48 E2	SPB869S	SPB51 C2	SPB51 E2
HA												
727							C	T	C			
751	A	A	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G
NA												
1161							A	A	G			
PB1												
1278							C	C	T			
2307	G	A	A									
PA												
1956	T	T	C									
NP												
153										C	C	T

в структуре гена NA замена A1161G приводила к замене аминокислоты T381A только у вируса A/Saint-Petersburg/RII48/2016 E2. У остальных вирусов мутаций в этом гене не обнаружено (табл. 4).

При анализе последовательности нуклеотидов в генах HA всех исследованных вирусов гриппа были обнаружены нуклеотидные замены только в HA вирусов, пассируемых в куриных эмбрионах — A751G. При этом, как видно из таблицы 3, эта замена оказалась идентичной и приводила к замене аминокислоты Q223R (табл. 4).

Таким образом, в ходе данной работы были получены данные о том, что 1–2-кратное пассирование вирусов гриппа в клетках MDCK не приводит к возникновению дополнительных мутаций в геноме вируса гриппа и генетический материал этого вируса идентичен генетическому материалу из клинического образца. При пассировании вирусов в куриных эмбрионах в течение 1–2-х пассажей генетический материал вируса отличается от генетического

материала из клинического образца, так как появляются мутации в рецепторной области гемагглютинаина, приводящие к замене аминокислот (Q223R). Мутация Q223R меняет рецепторную специфичность гемагглютинаина с рецепторов человеческого типа (α -2,6-сиаловые кислоты) на рецепторы птичьего типа (α -2,3-сиаловые кислоты). Полученные данные совпадают с данными японских исследователей, показавших, что аналогичная замена в гене гемагглютинаина выявлена у японских штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, пассируемых в куриных эмбрионах в течение 1–2 пассажей. При дальнейшем их пассировании в куриных эмбрионах количество мутаций в HA этих вирусов увеличивается [1].

Нами показано так же, что для генетического анализа эпидемически актуальных штаммов вирусов гриппа использование прямого секвенирования клинических образцов, содержащих генетический материал вирусов, дает возможность получить наиболее достоверные данные, повысить их оперативность, поскольку позволяет эко-

Таблица 4. Аминокислотные замены в поверхностных белках исследованных вирусов

Table 4. Aminoacid substitutions in surface proteins of analyzed viruses

Белок, позиция Protein, position	SPB362S	SPB3 C1	SPB3 E2	SPB425S	SPB7 C1	SPB7 E2	SPB812S	SPB48 C1	SPB48 E2	SPB869S	SPB51 C2	SPB51 E2
HA												
215							A	V	A			
223	Q	Q	R	Q	Q	R	Q	Q	R	Q	Q	R
NA												
381							T	T	A			

номить время, обычно затрачиваемое на вирус-выделение. В случае, если необходимо провести предварительное выделение вирусов, например, при отсутствии возможности провести полногеномную амплификацию из клинического образ-

ца (низкое содержание материала, присутствие ингибиторов ПЦР), оптимальным является вирус-выделение на клетках МДСК с минимальным количеством пассажей, что и используется в практике эпидемиологического надзора.

Список литературы/References

1. Ramadhany R., Yasugi M., Nakamura S., Daidoji T., Watanabe Y., Takahashi K., Ikuta K., Nakaya T. Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus. *Front. Microbiol.*, 2012, vol. 3, p. 128. doi: 10.3389/fmicb.2012.00128
2. Shepard S.S., Meno S., Bahl J., Wilson M.M., Barnes J., Neuhaus E. Viral deep sequencing needs an adaptive approach: IRMA, the iterative refinement meta-assembler. *BMC Genomics*, 2016, vol. 17, p. 708. doi: 10.1186/s12864-016-3030-6
3. Zhou B., Wentworth D.E. Influenza A virus molecular virology techniques. *Methods Mol. Biol.*, 2012, vol. 865, pp. 175–192. doi: 10.1007/978-1-61779-621-0_11

Авторы:

Фадеев А.В., научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Жилинская И.Н., д.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатории системной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Fadeev A.V., Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Zhilinskaya I.N., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of System Virology, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.06.2017
Принята к печати 27.06.2017

Received 16.06.2017
Accepted 27.06.2017

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВМЕСТНОГО ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛАКТОГЛОБУЛИНА И БАКТЕРИОФАГА САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО

Н.В. Алексанина, О.В. Моисеева

ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Широкое распространение лекарственноустойчивых форм возбудителей, затрудняющее профилактику и лечение острых кишечных инфекций, определяет целесообразность использования бактериофагов и иммунных лактоглобулинов для антибактериальной терапии этих заболеваний. Целью данного исследования явилось изучение антибактериальной эффективности совместного применения иммунного лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага при лечении экспериментального сальмонеллеза у мышей. Экспериментальную сальмонеллезную инфекцию воспроизводили путем однократного интрагастрального введения $2LD_{50}$ суточной агаровой культуры *S. typhimurium*. В результате отмечено развитие сальмонеллезной инфекции длительностью до 14 суток. Животные были разделены на четыре группы по характеру лечения. Для лечения животных применяли препараты: «Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл» коровий сухой, «Лактоглобулин» жидкий, бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE жидкий. Препараты вводили мышам перорально с помощью зонда через сутки после заражения в течение 7 дней. При изучении совместного лечебного действия лактоглобулина и бактериофага особое значение придавали срокам элиминации возбудителя из органов животных. Анализ полученных данных показал, что во всех четырех группах выявлена положительная динамика выведения из организма мышей возбудителя. В группах животных, получавших оба препарата, элиминация сальмонеллы из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в контрольных группах мышей. Одновременно в опытных группах уже на третьи сутки лечения препаратами выявлено статистически достоверное снижение количества *S. typhimurium* в содержимом толстого кишечника животных. В процессе исследования установлено, что применение для лечения животных иммунных лактоглобулинов в сочетании с сальмонеллезным бактериофагом в течение 7 дней уменьшало тяжесть и длительность течения заболевания и блокировало дальнейшее развитие инфекционного процесса, способствовало эффективному и быстрому очищению организма животных от возбудителя инфекции, повышало степень выживаемости мышей. Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод о целесообразности совместного применения препаратов иммунных лактоглобулинов и бактериофагов для лечения острых кишечных инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами сальмонелл.

Ключевые слова: сальмонеллезная инфекция, лактоглобулин, бактериофаг, животные, эксперимент.

Адрес для переписки:

Алексанина Наталья Владимировна
344010, Россия, г. Ростов-на-Дону, Газетный пер., 119,
Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии.
Тел.: 8 (863) 234-70-55 (служебн.); 8 961 288-02-59 (моб.).
E-mail: nataly10_09@mail.ru

Contacts:

Natalya V. Aleksanina
344010, Russian Federation, Rostov-on-Don, Gazetny per., 119,
Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology.
Phone: +7 (863) 234-70-55 (office); +7 961 288-02-59 (mobile).
E-mail: nataly10_09@mail.ru

Библиографическое описание:

Алексанина Н.В., Моисеева О.В. Экспериментальное изучение эффективности совместного лечебного действия лактоглобулина и бактериофага сальмонеллезного // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 297–302. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-297-302

Citation:

Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V. Experimental study of the effectiveness of the joint therapeutic action of lactoglobulin and salmonella bacteriophage // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 297–302. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-297-302

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE JOINT THERAPEUTIC ACTION OF LACTOGLOBULIN AND SALLMONELLA BACTERIOPHAGE

Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V.

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. The wide spread of drug-resistant forms of the pathogens, complicating prevention and treatment of acute intestinal infections, determines the feasibility of using bacteriophages and immune lactoglobulins for antibacterial therapy of these diseases. The aim of this study was to investigate the antibacterial efficacy of the joint use of immune lactoglobulin and Salmonella bacteriophage in the treatment of experimental salmonellosis in mice. The experimental Salmonella infection was reproduced by means of a single intragastric administration of 2LD₅₀ of daily agar culture of *S.typhimurium*. As a result, the development of Salmonella infection lasting up to 14 days was noted. The animals were divided into four groups according to the pattern of the treatment. The following preparations were used for the treatment of animals: «Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella» dry cow, «Lactoglobulin» liquid, bacteriophage of Salmonella ABCDE groups, liquid. The preparations were daily administered to mice orally after the infection for 7 days. In the study of the joint therapeutic effect of the lactoglobulin and bacteriophage the special attention was paid to the terms of elimination of the pathogen from animal organs. Analysis of the data showed that in all four groups a positive dynamics of excretion of the pathogen of mice was revealed. In groups of animals that were treated with both drugs, the elimination of Salmonella out of organs occurred 1.5 times faster than in the control groups of mice. At the same time in the experimental groups on the third day of treatment with preparations the statistically significant decrease in the number of *S.typhimurium* in the contents of the large intestine of animal was revealed. The study found that immune lactoglobulin used simultaneously with Salmonella phage for 7 days reduced the severity and duration of the disease course and blocked the further development of the infectious process, promoted the efficient and rapid cleansing of animals organism of the pathogen, increased the survival of mice. The obtained data suggest the applicability of joint use of immune lactoglobulin preparations and bacteriophages in the treatment of acute intestinal infections caused by antibiotic-resistant strains of Salmonella.

Key words: *Salmonella infection, lactoglobulin, bacteriophage, animals, experiment.*

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) на протяжении ряда лет занимают лидирующее место в структуре инфекционной патологии детского возраста и представляют одну из актуальных проблем здравоохранения и педиатрии. По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется более миллиарда диарейных заболеваний, при этом более половины случаев приходится на ранний детский возраст [4, 5].

Ведущее место в патологии детей первых лет жизни занимают ОКИ, вызванные антибиотикорезистентными штаммами сальмонелл. Сальмонеллы относятся к разряду внутригоспитальных и протекают в виде ограниченных вспышек или разрозненных спорадических заболеваний. Наиболее часто возбудителями сальмонеллезов у детей являются *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. Летальность при этих инфекциях достигает 30–60%. Лечение данного заболевания затруднено высокой частотой (60–90%) антибиотикорезистентности, проявлением токсических и многочисленных аллергических реакций, а также осложнениями в виде явлений дисбактериоза [2].

Широкое распространение лекарственно-устойчивых форм возбудителей в последние годы обусловило использование бактериофагов для антибактериальной терапии, альтернативно приему антибиотиков. Бактериофаги — биологические препараты антибактериального

действия для лечения и профилактики ОКИ и бактерионосительства, применение которых не нарушает нормального биоценоза человека. Бактериофаги незаменимы при устойчивости возбудителей к антибиотикам и химиопрепаратам, не вызывают побочных токсических и аллергических реакций, вызывают лизис бактерий, сочетаются с другими лекарственными средствами [3, 7].

Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл разработан в Ростовском НИИ микробиологии и паразитологии. Представляет собой стерильную лиофилизированную фракцию иммуноглобулинов молозивной сыворотки коров (IgG, IgA, IgM до 96% состава препарата), предварительно вакцинированных против комплекса возбудителей — микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции и дисбактериозы. Сочетает в себе свойства этиотропного и патогенетического средства. Нормализует микрофлору кишечника, обладает определенной степенью бифидогенности. Предназначен для лечения детей с дисбактериозами и острыми кишечными инфекциями, вызванными сальмонеллами, клебсиеллами, протеем, псевдомонадами и их ассоциациями. Препарат обладает антибактериальным, антитоксическим, антиадгезивным, иммуномодулирующим действием, совместим с антибиотиками и бактериофагами, препаратами нормофлоры [1, 6].

Целью данного исследования явилось изучение антибактериальной эффективности сов-

местного применения иммунного лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага при лечении экспериментальной сальмонеллезной инфекции у мышей.

Материалы и методы

Для проведения исследования нами была разработана модель сальмонеллезной инфекции и использован для заражения вирулентный штамм *S. typhimurium*. В качестве подопытных животных были взяты мыши белые беспородные весом 16–18 г. Моделирование сальмонеллезной инфекции проводили на группе животных, которым после суточного голодания интрагастралью однократно с помощью зонда в объеме 0,5 мл вводили 2LD₅₀ *S. typhimurium*. В результате отмечено развитие сальмонеллезной инфекции длительностью до 14 суток. Возбудитель высевался из печени, селезенки, тонкого и толстого кишечника. Для лечения животных применяли препараты «Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл» коровий сухой, «Лактоглобулин» жидкий, полученный методом мембранных технологий, бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE жидкий.

Препараты (лактоглобулины и бактериофаг) вводили мышам перорально с помощью зонда в количестве 0,5 мл через сутки после заражения ежедневно в течение 7 дней. Животных умерщвляли под эфирным наркозом, вскрывали после начала лечения препаратами на 1, 3, 5, 7, 10, 12 сутки, изучали динамику обсемененности органов (печени, селезенки, содержимого тонкого и толстого кишечника). Стерильно вырезанные кусочки органов методом отпечатков высевали на плотные питательные среды (BCA, среду Эндо). Содержимое толстого кишечника разводили 0,9% стерильным раствором NaCl от 10⁻¹ до 10⁻⁸ и делали высевы на BCA и среду Эндо. Идентификацию возбудителя проводили с использованием биохимических тест-систем и соответствующих сывороток.

Учитывали число павших животных в течение всего эксперимента. При изучении совместного лечебного действия лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага особое значение придавали срокам элиминации возбудителя инфекции из органов животных.

Исследование проводили на 4-х группах животных (табл. 1).

Экспериментальные исследования на животных проводили с учетом норм и правил биомедицинской этики с разрешения этического комитета Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии (Протокол № 1 от 15.01.2014 г.).

Результаты и обсуждение

Результаты изучения динамики выделения *S. typhimurium* из органов мышей в процессе лечения препаратами лактоглобулинов и бактериофагом представлены в таблице 2.

Анализ полученных данных показал, что во всех четырех группах животных мы наблюдали положительную динамику выведения из организма возбудителя. В группах мышей (3 и 4), леченных лактоглобулином совместно с бактериофагом, элиминация возбудителя из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в группах животных, получавших монопрепараты (1 и 2). При этом в этих группах происходит более быстрое очищение селезенки на 5-е сутки, печени на 7-е сутки, в то время как в первой и второй группах выделение *S. typhimurium* из этих органов продолжалось на 7-е сутки у 20% животных. Совместное лечение лактоглобулином и бактериофагом способствовало очищению от *S. typhimurium* тонкого кишечника на 7-е сутки в третьей группе и на 10-е сутки в четвертой группе, в двух других группах выделение *S. typhimurium* продолжалось на 10-е сутки у 20% животных. Очищение толстого кишечника происходило более медленно, возбудитель выделен на 12-е сутки от начала лечения в первой

Таблица 1. Препараты, использованные для лечения животных в основной и контрольной группах

Table 1. Preparations used for the treatment of animals in the main and control groups

Группа животных Groups of animals	Препараты для лечения Preparations for treatment
1 группа (контрольная) 1 st group (control)	Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл коровий сухой Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella, dry cow
2 группа (контрольная) 2 nd group (control)	Сальмонеллезный бактериофаг групп ABCDE жидкий Salmonella bacteriophage of ABCDE groups, liquid
3 группа (опытная) 3 rd group (experimental)	Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл и сальмонеллезный бактериофаг Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella and Salmonella bacteriophage
4 группа (опытная) 4 th group (experimental)	Лактоглобулин жидкий и сальмонеллезный бактериофаг Lactoglobulin liquid and Salmonella bacteriophage

и второй группах; в третьей и четвертой группах на 10–12 день от начала лечения *S. typhimurium* не выделялась.

Результаты количественного анализа высеваемости *S. typhimurium* из толстого кишечника мышей в процессе лечения лактоглобулином и бактериофагом в сравнении с контрольными группами представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, в опытных группах (3 и 4) уже на третьи сутки от начала лечения

происходит статистически достоверное снижение количества выделяемой *S. typhimurium* ($P < 0,05$). Выделение возбудителя в третьей группе продолжалось до 7-х суток и в четвертой группе до 10-х суток только у одного животного в количествах 1,3 lg и 1,2 lg КОЕ/г соответственно.

Прекращение выделения *S. typhimurium* у опытных животных происходит на 10-е и 12-е сутки, в то время как в двух контрольных группах возбудитель выделен на 12-е сутки от нача-

Таблица 2. Динамика выделения *S. typhimurium* из органов животных при экспериментальном сальмонеллезе в процессе лечения препаратами

Table 2. Dynamics of isolation of *S. typhimurium* from the animals, organs during the experimental salmonellosis in the process of treatment with preparations

Группа животных Group of animals	Органы животных Organs of animals	Дни от начала лечения Days from the beginning of treatment					
		1	3	5	7	10	12
		Количество животных, выделяющих <i>S. typhimurium</i> The amount of animals producing <i>S. typhimurium</i>					
		абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
1	Печень Liver	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)
2	Печень Liver	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)
3	Печень Liver	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
4	Печень Liver	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	5/5 (100)	3/3 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)

Примечание: числитель — число животных, выделяющих возбудитель; знаменатель — число обследованных животных.

Note: numerator — the number of animals producing the pathogen; denominator — the number of the examined animals.

Таблица 3. Влияние лактоглобулина и бактериофага на количественное содержание *S. typhimurium* в толстом кишечнике мышей при экспериментальном сальмонеллезеTable 3. The influence of lactoglobulin and bacteriophage on the quantitative content of *S. typhimurium* in the colon of mice during the experimental salmonellosis

Группа животных Group of animals	Дни от начала лечения Days from the beginning of treatment					
	1	3	5	7	10	12
	Количество <i>S. typhimurium</i> в Ig КОЕ/г (M±m) The amount of <i>S. typhimurium</i> in Ig CFU/g (M±m)					
1	6,7±0,4	5,7±0,2	3,8±0,2	2,8±0,4	1,4±0,1	1,2
2	6,8±0,2	5,6±0,2	3,7±0,3	2,7±0,1	1,6±0,1	1,5
3	6,6±0,3	4,5±0,2	2,6±0,1	1,3	0	0
4	6,8±0,4	4,7±0,2	2,8±0,5	1,4±0,1	1,2	0
	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	

ла лечения. Количество выделяемой из толстого кишечника мышей *S. typhimurium* в сравниваемые дни значительно ниже в опытных группах, чем в контрольных, начиная с третьего дня от начала лечения. Необходимо отметить, что эффект от совместного применения жидкого лактоглобулина, полученного методом мембранных технологий, и бактериофага был менее выраженным, что вероятно связано с низким содержанием специфических антител к сальмонелле в этом препарате.

Заключение

В результате эксперимента установлено, что лечение иммунным лактоглобулином в сочетании с сальмонеллезным бактериофагом в течение 7 дней уменьшало тяжесть и дли-

тельность течения заболевания и блокировало дальнейшее развитие инфекционного процесса, способствовало эффективному и быстрому очищению организма животных от возбудителя инфекции. В группах животных, получавших оба препарата, элиминация сальмонеллы из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в контрольных группах мышей. Одновременно в опытных группах уже на третьи сутки лечения препаратами выявлено статистически достоверное снижение количества *S. typhimurium* в содержимом толстого кишечника животных.

Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод о целесообразности совместного применения препаратов бактериофагов и иммунных лактоглобулинов для лечения ОКИ, вызванных антибиотикорезистентными штаммами сальмонелл.

Список литературы/References

- Алексанина Н.В., Соболева С.В. Микробиоценоз толстого кишечника детей с диарейными заболеваниями в процессе лечения лактоглобулином против условно-патогенных бактерий и сальмонелл // Актуальные вопросы инфекционной патологии. Ростов-на-Дону, 2009. С. 302–305. [Aleksanina N.V., Soboleva S.V. Microbiocenosis of children's colon with diarrheal diseases in the process of treatment with lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella. *Actual issues of infectious pathology. Rostov-on-Don, 2009, pp. 302–305.*]
- Воротынцева Н.В., Мазанкова Л.Н. Острые кишечные инфекции у детей. М.: Медицина, 2001. 480 с. [Vorotyntseva N.V., Mazankova L.N. *Ostrye kischechnye infektsii u detei* [Acute intestinal infections in children]. Moscow: Medicine, 2001, 480 p.]
- Дроздова О.М., Брусина Е.Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010. № 5. С. 20–24. [Drozdova O.M., Brusina E.B. Use of bacteriophages in epidemiological practice: a view after a century. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2010, no. 5, pp. 20–24. (In Russ.)*]
- О профилактике острых кишечных инфекций: Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 19 марта 2010 г. № 21. [On the prevention of acute intestinal infections: Resolution Chief State Sanitary Officer Russian Federation of 19 March 2010 no. 21]. URL: docs.cntd.ru/document/902206076 (15.06.2017)
- Онищенко Г.Г. Заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Российской Федерации // Иммунология. 2008. № 1. С. 18–23. [Onishchenko G.G. The incidence of acute intestinal infections in Russian Federation. *Immunologiya = Immunology, 2008, no. 1, pp. 18–23. (In Russ.)*]
- Соболева С.В. Лактоглобулины — препараты нового поколения для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и дисбактериозов // Актуальные вопросы инфекционной патологии. Ростов-на-Дону, 2009. С. 251–255. [Soboleva S.V. Lactoglobulins — a new generations of drugs for treatment and prevention of acute intestinal infections and dis-bacteriosis. *Actual issues of infectious pathology. Rostov-on-Don, 2009, pp. 251–255.*]

7. Урсова Н.И., Минухина А.М. Бактериофаги. Клинико-иммунологическая эффективность иммунологических препаратов // Под ред. М.П. Костинова, Н.В. Медуница. М., 2008. 256 с. [Ursova N.I., Minuhina A.M. Bakteriofagi. Kliniko-immunologicheskaya effektivnost' immunologicheskikh preparatov. Pod red. M.P. Kostinova, N.V. Medunitsina [Bacteriophages. Clinical and Immunological Efficacy of immunological preparations. Eds.: M.P. Kostinov, N.V. Medunitsin]. Moscow, 2008, 256 p.]

Авторы:

Алексанина Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории санитарной микробиологии водных объектов и микробной экологии человека, Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Моисеева О.В., младший научный сотрудник лаборатории санитарной микробиологии водных объектов и микробной экологии человека, Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:

Aleksanina N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Sanitary Microbiology of Water Bodies and Human Microbial Ecology, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Moiseyeva O.V., Junior Researcher, Laboratory of Sanitary Microbiology of Water Bodies and Human Microbial Ecology, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2017
Отправлена на доработку 15.05.2017
Принята к печати 23.06.2017

Received 30.03.2017
Revision received 15.05.2017
Accepted 23.06.2017

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОДЪЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2016 ГОДУ

Н.С. Башкетова¹, И.Г. Чхинджерия¹, М.А. Бичурина², Т.И. Крайнова¹, Е.А. Брянцева²,
И.Н. Лаврентьева², Л.П. Сухобаевская², О.В. Дегтярев³, Т.Е. Демакова³

¹ Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В России грипп и ОРВИ составляют до 90% от всей регистрируемой инфекционной заболеваемости ежегодно; экономический ущерб от этих инфекций достигает 86% от экономических потерь, связанных с инфекционными заболеваниями. В результате антигенного дрейфа или шифта появляются новые варианты вируса гриппа, в том числе пандемические штаммы. В 2009 г. возникла пандемия гриппа, вызванная шифтовым вариантом вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. Этот вирус вызывал эпидемические подъемы гриппа в мире и в последующие годы. Цель исследования — дать характеристику эпидемического процесса гриппа в январе–марте 2016 г. в Санкт-Петербурге. **Материалы и методы.** Заболеваемость гриппом и ОРВИ в Санкт-Петербурге регистрировалась по статистическим талонам по возрастным группам населения. При подозрении на гриппозную инфекцию исследовали носоглоточные смывы, полученные не позднее 3–4 дня от начала болезни, а в случае летального исхода — секционный материал (ткани бронхов, трахеи, легких, селезенки). Выявление РНК вирусов гриппа проводили в РТ-ПЦР (тест системы Амплисенс Influenza virus A/B, Амплисенс Influenza virus A/H1-swine-FL, Амплисенс Influenza virus A типа-FL, «Интерлабсервис», Москва); изоляцию вирусов гриппа из клинического материала — на культуре клеткой MDCK; изоляты типировали в РТГА с диагностическими сыворотками к эталонным и эпидемическим вирусам гриппа. **Результаты.** В 2016 г. показатель заболеваемости гриппом в Санкт-Петербурге составил 81,38 на 100 тыс. населения и был выше показателя заболеваемости в 2015 г. в 4,1 раза. Эпидемический подъем заболеваемости гриппом и ОРВИ начался с 3-й календарной недели, продолжался 6 недель, с пиком заболеваемости на 5-й календарной неделе. Всего за этот период переболело 398 675 человек, что составило 7,6% населения, в том числе взрослых — 184 658 (4%), детей 0–14 лет — 214 017 или 31,5% этой возрастной группы. Наибольшее число заболевших среди детей отмечено в группе 3–6 лет — 87 766 (41,0%). Среди заболевших детей 86,2% посещали детские дошкольные учреждения. За период эпидемического подъема 2016 г. вирусы гриппа выявлены у 297 человек (46,2%): вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 — в 97,1%, А(Н3N2) — в 0,6%, В — в 2,3% случаев. Было зарегистрировано 102 летальных исхода от осложнений после перенесенного гриппа, в том числе методом ПЦР подтвержден грипп А(Н1N1)pdm09 в 101 случае, и в одном случае — грипп А(Н3N2). Среди умерших 101 взрослый (в том числе 2 беременные женщины) и один ребенок. Все они были не привиты против гриппа ранее. Все умершие взрослые страдали хроническими соматическими заболеваниями.

Ключевые слова: заболеваемость гриппом, эпидемический процесс, вирусы гриппа, возрастная структура, вирусологический метод.

Адрес для переписки:

Чхинджерия Ирина Григорьевна
191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, 19,
Управление Роспотребнадзора по г. Санкт-Петербургу.
Тел.: 8 (812) 575-81-04.
E-mail: epidnadzor@78.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Irina G. Chkyhindzheriya
191025, Russian Federation, St. Petersburg, Stremyannaya str., 19,
Department of the Federal Service on Customers' Rights Protection
and Human Well-Being Surveillance for Saint Petersburg.
Phone: +7 (812) 575-81-04.
E-mail: epidnadzor@78.rosпотребнадzor.ru

Библиографическое описание:

Башкетова Н.С., Чхинджерия И.Г., Бичурина М.А., Крайнова Т.И.,
Брянцева Е.А., Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Дегтярев О.В.,
Демакова Т.Е. Эпидемический подъем заболеваемости гриппом
в Санкт-Петербурге в 2016 году // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7,
№ 3. С. 303–308. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-303-308

Citation:

Bashketova N.S., Chkyhindzheriya I.G., Bichurina M.A., Krainova T.I.,
Bryanceva E.A., Lavrentyeva I.N., Suhobaevskaya L.P., Degtyarev O.V.,
Demakova T.E. Epidemic rise in the incidence of influenza in St. Petersburg
in 2016 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2017, vol. 7, no. 3, pp. 303–308. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-303-308

EPIDEMIC RISE IN THE INCIDENCE OF INFLUENZA IN ST. PETERSBURG IN 2016

Bashketova N.S.^a, Chkyhindzheriya I.G.^a, Bichurina M.A.^b, Krainova T.I.^a, Bryanceva E.A.^b, Lavrentyeva I.N.^b, Suhobaevskaya L.P.^b, Degtjarev O.V.^c, Demakova T.E.^c

^a *Department of the Federal service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance for St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation*

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

^c *Centre of Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Influenza and acute respiratory viral infections (ARVI) account for up to 90% of the total reported infectious morbidity annually in Russia. The economic damage from these infections reaches 86% of the economic losses associated with infectious diseases. As a result of antigenic drift or a shift, new variants of the influenza virus, including pandemic strains, appear. In 2009, an influenza pandemic arose due to the shifter version of the influenza A (H1N1) pdm09 virus. This virus caused epidemic rises of influenza in the world in subsequent years. The aim of the study was to describe the epidemic process of influenza in January–March 2016 in St. Petersburg. *Materials and methods.* The incidence of influenza and acute respiratory viral infections in St. Petersburg was recorded according to statistical coupons by age groups of the population. Examined nasopharyngeal flushes received no later than 3–4 days from the onset of the disease, and in case of a lethal outcome — sectional material (bronchi, trachea, lungs, spleen tissues). The detection of RNA of influenza viruses was carried out in RT-PCR (Amplicenc Influenza virus A/B, Amplicenc Influenza virus A/H1-swine-FL, Amplicenc Influenza virus A типа-FL, «Interlabservice», Moscow). Isolation of influenza viruses from the clinical material was carried out on culture by the MDSC cell. Isolates were typed in RTGA with diagnostic sera to reference and epidemic influenza viruses. Isolation of influenza viruses from the clinical material was carried out on culture by the MDSC cell. Isolates were typed in RTGA with diagnostic sera to reference and epidemic influenza viruses. *Results.* In 2016, the incidence of influenza in St. Petersburg was 81.38 per 100 000 population and was 4.1 times higher than the incidence rate in 2015. The epidemic rise in the incidence of influenza and ARVI began with the 3rd calendar week, lasted 6 weeks, with a peak incidence at the 5th calendar week. In total, 398 675 people (7.6% of the population) were ill during this period, including adults — 184 658 (4%), children 0–14 years old — 214 017 or 31.5% of this age group. The greatest number of cases among children was registered in the group of 3–6 years — 87 766 (41.0%). Among the ill children, 86.2% attended pre-school children's institutions (kindergartens). During the epidemic recovery in 2016, influenza viruses were detected in 297 people (46.2%): the influenza A (H1N1) virus pdm09 in 97.1% of cases, A (H3N2) — 0.6%, B — 2.3%. There were 102 deaths from complications after the influenza, including 101 cases of influenza A (H1N1) and A (H3N2) influenza A (H1N1) pdm09 confirmed by PCR. Among the dead 101 adults (including 2 pregnant women) and one child. All of them were not vaccinated against the flu earlier. All deceased adults suffered from chronic physical illnesses.

Key words: *influenza morbidity, epidemic process, influenza viruses, age distribution, virological method.*

Введение

Грипп и другие респираторные вирусные инфекции являются наиболее массовыми и распространенными заболеваниями, поражающими все возрастные группы населения. По данным Всемирной организации здравоохранения, каждый год гриппом инфицируется около одного миллиарда человек, из которых 3–5 млн переносят заболевание с осложнениями и 300–500 тыс. погибают. В России на грипп и ОРВИ ежегодно приходится до 90% от всей регистрируемой инфекционной заболеваемости, причем экономический ущерб от этих инфекций составляет 86% от экономических потерь, связанных с инфекционными заболеваниями.

Сложность борьбы с гриппом определяется, прежде всего, постоянной изменчивостью возбудителя, что позволяет вирусу уклоняться от специфического иммунитета и, вследствие этого, вызывать ежегодные эпидемии. В результате антигенного дрейфа или шифта вируса гриппа появляются новые варианты вируса,

в том числе наиболее опасные для человеческой популяции пандемические штаммы. Эта особенность вируса гриппа позволяет патогену ежегодно вызывать сезонные подъемы заболеваемости, несмотря на широкое использование противогриппозных вакцин и других средств профилактики.

В 2009 г. возникла пандемия гриппа, вызванная шифтовым вариантом вируса гриппа А(H1N1)pdm09 [3, 4, 5, 10, 13–15]. Этот вирус вызывал эпидемические подъемы гриппа в мире, в том числе в России, и в последующие годы [8, 9]. Для эпидемий, этиологическим агентом которого является вирус гриппа А(H1N1)pdm09, была характерна высокая летальность. По данным Национальных центров по гриппу при ФГБУ НИИ гриппа и ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, получающих сведения с 59 административных территорий Российской Федерации, в 2016 г. направление распространения эпидемии было необычным — с запада на восток. При этом частота госпитализации была высокая, особенно среди лиц стар-

ше 65 лет и процент летальности был выше, чем в предшествующие сезонные эпидемии [1, 6, 7, 11, 12]. При секвенировании генома вируса гриппа были обнаружены аминокислотные замены в гемагглютинине в рецепторсвязывающем и SA-сайтах, и генах, кодирующих внутренние белки (PA, NP, M1, Ns1), с чем, возможно, были связаны эпидемические события [10].

Цель исследования: дать характеристику эпидемического процесса гриппа в январе–марте 2016 г. в Санкт-Петербурге, используя вирусологические и молекулярно-биологические методы исследования.

Материалы и методы

Заболеваемость гриппом и ОРВИ в Санкт-Петербурге регистрировалась на основании данных статистических талонов ежедневно по возрастным группам населения. Регистрация госпитализированных больных и летальных исходов проводилась в системе автоматизированного учета САУ «инфекция» на основе персонифицированного учета инфекционных больных.

При подозрении на гриппозную инфекцию проводили забор носоглоточных смывов не позднее 3–4 дня от начала болезни. В случае летального исхода брали секционный материал (ткани бронхов, трахеи, легких, селезенки).

Выявление РНК вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, А(H1N1), А(H3N2) и В проводили в ПЦР в режиме реального времени с помощью тест систем Амплисенс Influenza virus A/B, Амплисенс Influenza virus A/H1-swine-FL, Амплисенс Influenza virus A типа-FL («Интерлабсервис», Москва) согласно инструкциям производителей.

Изоляцию вирусов гриппа проводили из клинического материала на культуре клеток MDCK в соответствии с рекомендациями [2].

Типирование изолятов выполняли в реакции торможения гемагглютинации по общепринятой методике с диагностическими сыворотками к эталонным и эпидемическим штаммам вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, А(H1N1), А(H3N2) и В двух линий: В/Ямагатоподобной и В/Викторияподобной.

Всего методом ПЦР с 51 недели 2015 г. по 13 неделю 2016 г. был исследован материал от 887 больных гриппом и ОРВИ; вирусологическим методом был исследован материал от 211 умерших с предварительным диагнозом «Грипп» и «ОРВИ». В период с 7 по 15 неделю 2016 г. вирусологическим методом был исследован материал от 130 больных с диагнозом «Грипп», подтвержденным методом ПЦР.

Статистическая обработка данных была проведена с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В 2016 г. показатель суммарной заболеваемости гриппом и ОРВИ в Санкт-Петербурге составил 35897,28 на 100 тыс. населения и был выше подобного показателя в 2015 г. на 38,1%. Показатель заболеваемости гриппом составил 81,38 на 100 тыс. населения и был выше показателя заболеваемости в 2015 г. в 4,1 раза.

Эпидемический подъем заболеваемости гриппом и ОРВИ в Санкт-Петербурге начался с 3-й календарной недели (11–17.01.2016 г.), когда показатель заболеваемости составил 83,5 на 100 тыс. населения, превысив уровень значения недельного эпидемического порога на 28,8%. Пик заболеваемости оказался на 5-й календарной неделе (25–31.01.2016 г.) и составил 187,42, когда переболело 97 302 человека. Всего эпидемический подъем продолжался 6 недель, за этот период переболело 398 675 человек, что составило 7,6% населения, в том числе взрослых — 184 658 (4%), детей 0–14 лет — 214 017 или 31,5% этой возрастной группы. Наибольшее число заболевших среди детей было в группе 3–6 лет — 87 766 (41,0%), в группе детей 0–2 года — 63 302 (29,6%), детей 7–14 лет — 62 949 (29,4%).

Среди заболевших 86,2% посещали детские дошкольные учреждения. Максимальное количество заболевших (80%) пришлось на февраль, в марте случаи гриппа среди детей не регистрировались.

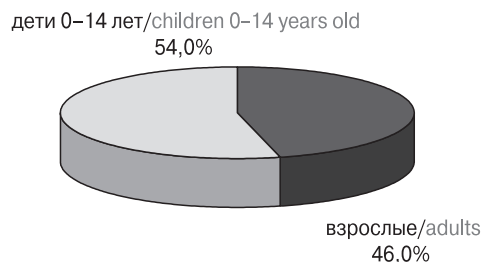
Структура заболеваемости гриппом и ОРВИ в период эпидемического подъема 2016 г. представлена на рисунке 1.

За период эпидемического подъема в Санкт-Петербурге учебный процесс был приостановлен на 7 дней в 32 школах и 4 дошкольных учреждениях, в 2788 классах 632 школ, 898 группах 525 детских дошкольных учреждений и в 13 группах 7 учреждений среднего профессионального образования.

По инициативе Управления и при поддержке Комитета по образованию в городе были введены дополнительные каникулы для обучающихся первых классов с 01.02 по 14.02.2016 г. (14 дней), для обучающихся 2–4 классов — с 01.02. по 07.02.2016 г. (7 дней), запрещен отдых детей в загородных лагерях отдыха во время дополнительных каникул.

За период эпидемии было госпитализировано с диагнозом «Грипп» и «ОРВИ» 9745 человек, что составило 2,4% от заболевших, в том числе 4923 ребенка 0–14 лет — 6,9% от заболевших данной возрастной группы. Для госпитализации больных проведено поэтапное перепрофилирование 16 стационаров. Для лечения взрослых больных в 8 государственных учреждениях здравоохранения развернуто 1612 коек, для госпитализации детей было предоставле-

Структура переболевших гриппом и ОРВИ
Structure of the flu and ARVI



Возрастная структура переболевших гриппом и ОРВИ детей до 14 лет
Age structure of children ill with influenza and acute respiratory infections under 14

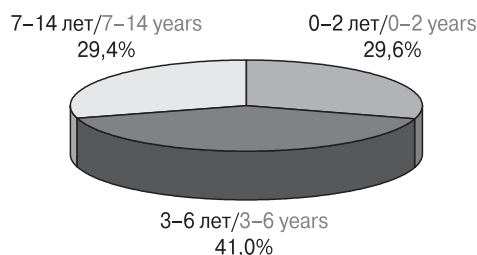


Рисунок 1. Структура заболеваемости гриппом и ОРВИ в период эпидемического подъема 2016 г.
Figure 1. Structure of the incidence of influenza and ARVI in the period of epidemic recovery in 2016

но 1265 коек, для госпитализации беременных женщин определены 2 стационара. Были утверждены схемы маршрутизации больных при их госпитализации в стационары в зависимости от возраста, состояния (наличие беременности, хронических заболеваний и другое) и степени тяжести клинического течения.

Было зарегистрировано 102 летальных исхода от осложнений после перенесенного гриппа, в том числе методом ПЦР подтвержден грипп А(H1N1)pdm09 в 101 случае, и в одном случае — грипп А(H3N2). Летальные исходы зарегистрированы у 63 (61,8%) лиц мужского пола и 39 (38,2%) женщин. Среди умерших 101 взрослый (99,0%), в том числе 2 беременные женщины, и один ребенок. Все они были не привиты против гриппа ранее. Все умершие взрослые страдали хроническими соматическими заболеваниями: сердечно-сосудистой системы — 82,2%, эндокринными заболеваниями — 55,4%, заболеваниями бронхо-легочной системы — 22,7%. В возрастной структуре наибольший процент

умерших был среди лиц в возрасте 60 лет и старше (41, 2%), наименьший — в возрасте 20–29 лет (1,9%). Все летальные исходы были рассмотрены на врачебных комиссиях по месту госпитализации больных. Согласно экспертным заключениям комиссий медицинская помощь во всех случаях была оказана своевременно, в полном объеме, качественно.

Мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа и других респираторных вирусов проводился методом ПЦР в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург». Ежедневно исследовали материал от 50 и более лиц на наличие вирусов гриппа разных серотипов, вирусов парагриппа четырех серотипов, респираторно-синцитиального вируса, аденовируса и других вирусов. Начиная с 51 недели 2015 г. в материале от больных была выявлена РНК вируса гриппа А(H1N1)pdm09. За период эпидемического подъема респираторные вирусы обнаружены у 59,6% от числа обследованных больных. Вирусы гриппа выявлены у 297 человек (46,2%), прочие респираторные вирусы — у 86 человек (12,6%) от общего числа обследованных.

Из обнаруженных методом ПЦР вирусов доля вируса гриппа А(H1N1)pdm09 составила 97,1%, А(H3N2) — 0,6%, В — 2,3%.

Мониторинг циркуляции вирусов гриппа и других респираторных вирусов представлен на рисунке 2.

При вирусологическом исследовании носоглоточных смывов, взятых у больных гриппом в период с 7 по 15 неделю 2016 г., выделено 14 вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и 7 вирусов гриппа типа В. Все вирусы гриппа А(H1N1)pdm09 были выделены в период с 7 по 10 неделю, вирусы гриппа В — с 12 по 15 неделю. В рассматриваемый период вирусологическим методом вирусы гриппа А(H3N2) не были обнаружены. Выделенные в лаборатории ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Санкт-Петербург вирусы гриппа были направлены для идентификации в ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России.

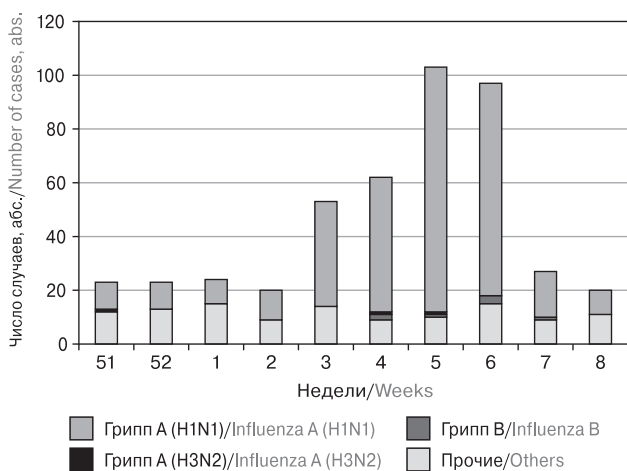


Рисунок 2. Мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа и других ОРВИ

Figure 2. Monitoring the circulation of influenza viruses and other ARV

Исследование патологоанатомического материала в случаях летальных исходов от гриппа, ОРВИ, внебольничных пневмоний осуществлялось в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Санкт-Петербурге». Секционный материал при обнаружении вирусов гриппа был направлен в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Эпидемия гриппа в Санкт-Петербурге началась на третьей календарной неделе и город первым вступил в эпидемический процесс среди территорий Северо-Западного федерального округа (СЗФО).

Пик заболеваемости был на пятой календарной неделе, эпидемический процесс продолжался 6 недель, за этот период переболело 7,6% населения, наибольшее число заболевших было в группе детей 3–6 лет. За период эпидемии было госпитализировано 2,4% от числа заболевших. В Санкт-Петербурге было зарегистрировано 102 летальных исхода, среди умерших 99,0% составляли взрослые. В 101 случае методом ПЦР подтвержден грипп А(Н1N1)pdm09.

По данным Т.В. Яковлевой с соавт. [12], где использованы общероссийские сведения из форм статистического учета № 1 и № 2, в эпидемию 2016 г. в России основная часть заболеваний была у лиц в возрасте 45–59 лет. Из числа умерших 4,4% составляли дети. Наибольший показатель летальности был установлен в Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах (4,43 и 4,59%). Они более чем в три раза превышали общероссийский показатель равный 0,95% ($p < 0,05$). У большинства умерших имело место позднее обращение за медицинской помощью, длительность промежутка времени от начала заболевания до обращения за медицинской помощью в среднем по стране составила 4,76 дня. Из общего числа умерших от гриппа 73% имели заболевания сердечно-сосудистой системы.

Высокая контагиозность инфекции, биологические особенности возбудителя свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования надзора и контроля гриппозной инфекции.

Список литературы/References

1. Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В., Феодоритова Е.Л., Беляев А.Л., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Оскерко Т.А., Аристова В.А., Львов Д.К. Заболеваемость гриппом в январе-марте 2016 г. в РФ, эпидемический и пандемический потенциал вируса гриппа А (H1N1)pdm09 // Пульмонология. 2016. Т. 26, № 4. С. 436–443. [Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Belyaev A.L., Krasnoslobodtsev K.G., Mukasheva E.A., Garina E.O., Oskerko T.A., Aristova V.A., L'vov D.K. Flu morbidity in January-March, 2016, in Russian Federation. Epidemic and pandemic potential of A/H1N1pdm09 influenza virus. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2016, vol. 26, no. 4, pp. 436–443. doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-436-443 (In Russ.)]
2. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: методические рекомендации № 0100/4430-06-34 (утверждены Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. № 100/4430-06-34). М., 2006. [Selection of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification: methodical recommendations No. 0100/4430-06-34 (app. The Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare on April 18, 2006). Moscow: 2006.]
3. Гендон Ю.З. Возможность предсказания пандемий гриппа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 3. С. 113–120. [Ghendon Yu.Z. Possibility of influenza pandemic prediction. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 3, pp. 113–120. (In Russ.)]
4. Гендон Ю.З. Свиной грипп H1N1/Калифорния — страсти и факты // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010. № 4. С. 105–114. [Ghendon Yu.Z. Swine-origin influenza H1N1/California — passions and facts. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, no. 4, pp. 105–114. (In Russ.)]
5. Карпова Л.С., Маринич И.Г., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Эпидемиология гриппа А (H1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009–2010 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 3. С. 14–20. [Karpova L.S., Marinich I.G., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P. Epidemiology of influenza A/California/07/09 (H1N1) in population of 49 cities in Russia in 2009–2010. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 3, pp. 14–20. (In Russ.)]
6. Карпова Л.С., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Столяров К.А., Коншина О.С., Соминина А.А. Эпидемиологические особенности эпидемии гриппа 2016 года в Санкт-Петербурге // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 89, № 4. С. 13–21. [Karpova L.S., Popovtseva N.M., Carpenter T.P., Stolyarov K.A., Konshin O.S., Sominina A.A. Epidemiological characteristics of the epidemic influenza in 2016 in St. Petersburg. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, vol. 89, pp. 13–21. (In Russ.)]
7. Карпова Л.С., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Столяров К.А., Соминина А.А., Бурцева Е.И. Анализ эпидемии гриппа 2016 года и пандемии 2009 года по материалам двух национальных центров ВОЗ в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 89, № 4. С. 4–12. [Karpova L.S., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Stolyarov K.A., Sominina A.A., Burtseva E.I. Analysis of the flu epidemic of 2016 and pandemic 2009 on materials of two national centres of the who in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, vol. 89, no. 4, pp. 4–12. (In Russ.)]
8. Карпова Л.С., Соминина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Киселев О.И. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа А (H1N1)pdm09

- в период с 2009 по 2013 гг. // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 3. С. 19–24. [Karpova L.S., Somnina A.A., Burtseva E.I., Pelikh M.Yu., Feodoritova E.L., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Kiselev O.I. Comparison of the influenza epidemics in Russia caused by the pandemic virus A(H1N1)pdm09 within the period from 2009 to 2013. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 19–24. (In Russ.)]
9. Карпова Л.С., Сомнина А.А., Пелих М.Ю., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Бурцева Е.И., Киселев О.И. Эпидемия гриппа в России в сезон 2012–2013 годов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. Т. 71, № 4. С. 7–13. [Karpova L.S., Somnina A.A., Pelikh M.Yu., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Burtseva E.I., Kiselev O.I. Influenza epidemic in Russia in season 2012–2013. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2013, vol. 71, no 4, pp. 7–13. (In Russ.)]
 10. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федакина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Феодоритова Е.Л., Беляев А.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Оскерко Т.А., Аристова В.А., Вартанян Р.В., Кистенева Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Кружкова И.С., Базарова М.В., Девяткин А.В. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015–2016 гг.: доминирование вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария // Вопросы вирусологии. 2016. Т. 61, № 4. С. 159–166. [L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Belyaev A.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Mukasheva E.A., Garina E.O., Oskerko T.A., Aristova V.A., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Deryabin P.G., Prilipov A.G., Al'khovskii S.V., Kruzhkova I.S., Bazarova M.V., Devyatkin A.V. Virological, epidemiological, clinical and molecular genetic features of influenza epidemics 2015–2016: dominance of influenza A(H1N1)pdm09 in Russia and the countries of the Northern hemisphere. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, vol. 61, no. 4, pp. 159–166. doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-159-16 (In Russ.)]
 11. Пritулина Ю.Г., Саломяхин Г.Г., Пегусов С.М., Фролихина Е.Н. Сравнительная характеристика течения гриппа типа А/H1N1 в 2009 и 2016 годах // Здоровье и образование в 21 веке. 2016. Т. 18, № 2. С. 40–42. [Pritulina Y.G., Salomakhin G.G., Paegusov S.M., Frolikhina E.N. Comparative characteristics of the course Influenza A/H1N1 in 2009 and 2016 years. *Zdorov'e i obrazovanie v 21 veke = Health and Education in 21st Century*, 2016, vol. 18, no 2, pp. 40–42. (In Russ.)]
 12. Яковлева Т.В., Брико Н.И., Герасимов А.Н., Салтыкова Т.С., Поздняков А.А. Сравнительная характеристика эпидемических сезонов гриппа 2015–2016 гг. и 2009–2010 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 1. С.11–19. [Yakovleva T.V., Briko N.I., Gerasimov A.N., Saltykova T.S., Pozdnyakov A.A. Comparative characteristic of epidemic influenza season 2015–2016 and 2009–2010. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, no. 1, pp. 11–19. (In Russ.)]
 13. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessio W.M. Antigenic avian abd genetic characteristics of swine-origin 2009 (H1N1) influenza virus circulating in humans. *Science*, 2009, vol. 325, no. 5937, pp. 197–201 doi: 10.1126/science.1176225
 14. WHO. New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation. *Weekly Epidemiol. Rec.*, 2009, vol. 84, no. 25, pp. 249–257.
 15. WHO. Pandemic (H1N1) 2009. Update 58.

Авторы:

Башкетова Н.С., руководитель Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия;
Чхинджерия И.Г., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия;
Бичурина М.А., д.м.н., зав. лабораторией этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Крайнова Т.И., специалист отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия;
Брянцева Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Лаврентьева И.Н., д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Сухобаевская Л.П., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Дегтярев О.В., вирусолог ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге, Санкт-Петербург, Россия;
Демакова Т.Е., бактериолог ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Bashketova N.S., Head of the Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;
Chkyhindzheriya I.G., Head of Epidemiological Surveillance Department, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;
Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Aetiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Krainova T.I., Specialist Of Epidemiological Surveillance Department, Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;
Bryanceva E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher; Laboratory of Aetiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Lavrentieva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Suhobaevskaya L.P., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Degtjarev O.V., Virologist, Centre of Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;
Demakova T.E., Bacteriologist, Centre of Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St. Petersburg, 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, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 Каталог «Роспечать» — индекс 95001;
 Объединенный каталог «Пресса России» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.agrk.org — индекс 41392.
 Цена свободная.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авдонина Л.Г.	271	Моисеева О.В.	297
Аксанина Н.В.	297	Мошев А.В.	259
Барышникова Л.А.	285	Нгуен Т.З.Л.	219
Башкетова Н.С.	303	Неняйкин С.С.	285
Баязитова Л.Т.	271	Нестерова И.В.	219
Бичурина М.А.	303	Патяшина М.А.	271
Борисов А.Г.	259	Первова О.В.	259
Брянцева Е.А.	303	Пузырева Л.В.	251
Ваганова А.Н.	231	Савченко А.А.	259
Гвоздев И.И.	259	Сухобаевская Л.П.	303
Далабаева Л.М.	251	Тюпкина О.Ф.	271
Дегтярев О.В.	303	Тюрин Ю.А.	271
Демакова Т.Е.	303	Фадеев А.В.	292
Евглевский А.А.	219	Чазова Т.А.	271
Жестков А.В.	285	Черданцев Д.В.	259
Жилинская И.Н.	292	Чудилова Г.А.	219
Зарипова А.З.	271	Чхинджерия И.Г.	303
Исаева Г.Ш.	271	Юзлибаева Л.Р.	271
Исматуллин Д.Д.	285	Boiro M.Y.	245
Ковалев А.М.	285	Kalinina O.V.	245
Ковалева С.В.	219	Lichnaia E.V.	245
Колесникова Н.В.	219	Petlenko S.V.	279
Конченко В.Д.	251	Redlich G.	279
Крайнова Т.И.	303	Savelyev S.A.	279
Кудрявцев И.В.	259	Smirnov V.S.	279
Лаврентьева И.Н.	303	Stukan N.I.	279
Ломтатидзе Л.В.	219	Totolian Areg A.	245
Лямин А.В.	285		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптационные мутации	292	полногеномное секвенирование	292
активность ферментов	259	послеоперационный период	259
антибиотикорезистентность	271	реструктуризация хроматина	219
бактериофаг	297	рецепторная специфичность	292
вирус гриппа А	292	сальмонеллезная инфекция	297
вирусологический метод	303	сепсис	251
вирусы гриппа	303	серотипирование	271
ВИЧ-инфекция	251	тромбоцитопения	251
внебольничная пневмония	271	устойчивость	231
возрастная структура	303	фенотип	259
гемагглютинин	292	фторхинолоны	231
грамотрицательный сепсис	251	цитокинопродукция	219
грамположительный сепсис	251	эксперимент	297
ДНК-гибридизация	285	экстрацеллюлярные сети	219
животные	297	эпидемиологический надзор	292
заболеваемость гриппом	303	эпидемический процесс	303
идентификация микроорганизмов	285	clinical trial	279
иммуносупрессия	251	diagnostic test systems	245
иммунофенотип	219	efficacy	279
инфекции	231	external anogenital (venereal) warts	279
инфекционный эндокардит	251	genotype	245
лактоглобулин	297	hepatitis C virus	245
метаболизм	259	Imiquimod	279
микобактериозы	285	MALDI-ToF масс-спектрометрия	285
микоплазмы	231	MDR-транспортеры	231
микробицидность	219	molecular markers	245
мутации	231	Republic of Guinea	245
нейтрофильные гранулоциты	219, 259	safety	279
нетуберкулезные микобактерии	285	serological markers	245
носительство	271	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	271
перитонит	259	Wartocid	279
пневмококковые инфекции	271		

ОТДЕЛ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА

ОСУЩЕСТВЛЯЕТ ПРОМЫШЛЕННЫЙ
ВЫПУСК РАЗЛИЧНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ ПО СЛЕДУЮЩИМ ОСНОВНЫМ
НАПРАВЛЕНИЯМ:



■ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

для диагностики: лептоспироза,
Ку-риккетсиоза.

■ АГГЛЮТИНАЦИОННЫЕ ТЕСТЫ

для диагностики: кори, сальмонеллеза,
кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза.

■ РЕАКТИВЫ ДЛЯ ОКРАСКИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ

окраски по Граму, по Цилю–Нильсену, цитохромоксидазы (по Эрлиху и Ковачу).

■ НАБОРЫ СРЕД И РЕАКТИВОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ МИКРООБЪЁМНОЙ БИОХИМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

индола, триптофандезаминазы и фенилаланиндезаминазы, уреазы, лизиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы, орнитиндекарбоксилазы, ацетоина, глюкозы (ферментация и окисление), сахаров, углеводов, сероводорода, нитратредуктазы, цитрата натрия, ацетата натрия, эскулина, бета-лактамазы.

■ СЕЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ, ДОБАВКИ И ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОУЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

следующих микроорганизмов: микоплазм, уреоплазм, синегнойной палочки, бактерий родов протеус, провиденция, морганелла, клебсиелл, влагалищных трихомонад, гонококка, грибов рода кандиды.

■ ДИСКИ С ПРОТИВОМИКРОБНЫМИ, ПРОТИВОГРИБКОВЫМИ И ИНДИКАТОРНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

более 70 наименований.

БОЛЕЕ ПОДРОБНО ОЗНАКОМИТЬСЯ С НАШЕЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ НА НАШЕМ САЙТЕ

www.dntpasteur.ru

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Отдел Новых Технологий

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14, т. (812) 313-69-88, dntpasteur@yandex.ru



Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

