

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

октябрь–декабрь
2017, том 7

№ 4

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 Ангеловфа, 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
Фрейдлин 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 18.12.2017 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12,5.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1285

© 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)

October–December

2017, volume 7

No. 4

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

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

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

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

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

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

Yuri V. Lobzin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, 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
Lidiia 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 18.12.2017. 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

Зарубаев В.В., Слита А.В., Лаврентьева И.Н., Смирнов В.С.

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ 319

Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г.

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ И РОЛЬ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА В ПАТОГЕНЕЗЕ
ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ** 327

Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Симбирцев А.С.

**ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМА ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ
С РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ** 341

Оригинальные статьи

Любимова А.В., Ряховских С.А., Шалапина Н.А., Бродина Т.В., Аверьянова М.Ю., Асланов Б.И., Нечаев В.В.

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОТДЕЛЕНИИ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА** 350

*Брико Н.И., Лопухов П.Д., Каприн А.Д., Новикова Е.Г., Трушина О.И., Халдин А.А., Жукова О.В.,
Исаева Д.Р., Скворцова А.И.*

**ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ В СТРУКТУРЕ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ
И ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, В МОСКВЕ И В РОССИИ** 359

*Вязовая А.А., Ахмедова Г.М., Соловьева Н.С., Герасимова А.А., Старкова Д.А., Туркин Е.Н., Журавлев В.Ю.,
Нарвская О.В., Мокроусов И.В.*

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ РОССИИ:
10 ЛЕТ СПУСТЯ** 367

*Попова А.Ю., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Войтенкова Е.В., Забровская А.В., Егорова С.А., Макарова М.А.,
Матвеева Э.Н., Зуева Е.В., Порин А.А., Буаро М.И., Константинов О.К., Тотолян Арег А.*

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЖИТЕЛЕЙ
ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ И РОССИИ** 375

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

**РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В У HBsAg-НЕГАТИВНЫХ ДОНОРОВ КРОВИ
В г. АСТАНА, КАЗАХСТАН** 383

Харченко Е.П.

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В ГЕНОМЕ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА МАЛЫХ ГОМОЛОГИЧНЫХ
И КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ФРАГМЕНТОВ И ВОЗМОЖНАЯ ИХ РОЛЬ** 393

Гребенкина Н.С., Контаров Н.А., Юминова Н.В.

ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА 405

Краткие сообщения

Мартынова А.В., Горькавая А.Ю., Абашина В.Л., Семейкина Л.М.

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ
В ЛПМО ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ** 409

Садрудинова Г.Р.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ К. ОХУТОСА 413

Афиногенова А.Г., Краева Л.А., Афиногенов Г.Е., Веретенников В.В.

**ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ЧИСТЯЩИЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПОВЕРХНОСТЕЙ КАК ВОЗМОЖНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА
ТРАДИЦИОННЫМ ДЕЗИНФЕКТАНТАМ** 419

Правила для авторов 425

Авторский указатель 428

Предметный указатель 428

CONTENTS

Reviews

Zarubaev V.V., Slita A.V., Lavrentyeva I.N., Smirnov V.S.

PROTECTIVE ACTIVITY OF ASCORBIC ACID AT INFLUENZA INFECTION 319

Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G.

METHODS OF ESTIMATION AND THE ROLE OF RESPIRATORY BURST IN THE PATHOGENESIS OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES 327

Shabaldin A.V., Shabaldina E.V., Simbirtsev A.S.

FEATURES OF THE MICROBIOME OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT IN CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY DISEASES 341

Original articles

Lyubimova A.V., Ryakhovskikh S.A., Shalyapina N.A., Brodina T.V., Averyanova M.Yu., Aslanov B.I., Nechaev V.V.

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF BACTERIAL INFECTIONS IN BONE MARROW TRANSPLANT UNITS 350

Briko N.I., Lopukhov P.D., Kaprin A.D., Novikova E.G., Trushina O.I., Khaldin A.A., Zhukova O.V., Isaeva D.R., Skvortsova A.I.

HPV-ASSOCIATED DISEASES IN THE STRUCTURE OF FEMALE REPRODUCTIVE TRACT TUMORS AND SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS IN MOSCOW AND RUSSIA 359

Vyazovaya A.A., Akhmedova G.M., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Starkova D.A., Turkin E.N., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS IN THE KALININGRAD REGION OF RUSSIA: 10 YEARS AFTER 367

Popova A.Yu., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Voitenkova E.V., Zabrovskaia A.V., Egorova S.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Zueva E.V., Porin A.A., Boiro M.Y., Konstantinov O.K., Totolian Areg A.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INTESTINE MICROBIOME OF REPUBLIC OF GUINEA AND RUSSIAN FEDERATION RESIDENTS 375

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

RESULTS OF GENOTYPING HEPATITIS VIRUS B IN HBsAg-NEGATIVE BLOOD DONORS IN ASTANA, KAZAKHSTAN 383

Kharchenko E.P.

OCCURRENCE OF SMALL HOMOLOGOUS AND COMPLEMENTARY FRAGMENTS IN HUMAN VIRUS GENOMES AND THEIR POSSIBLE ROLE 393

Grebyonkina N.S., Kontarov N.A., Yuminova N.V.

THE STUDY OF INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE HYDRATION DEGREE 405

Short communications

Martynova A.V., Gorkavaya A.Yu., Abashina V.L., Semeikina L.M.

EPIDEMIOLOGY ASPECTS OF HOSPITAL-ACQUIRED INFECTION MORBIDITY IN HEALTH SURGERY HOSPITALS IN PRIMORSKY REGION 409

Sadrtdinova G.R.

K. OXYTOCA BACTERIOPHAGES ISOLATION METHODS IMPROVEMENT 413

Afinogenova A.G., Kraeva L.A., Afinogenov G.E., Veretennikov V.V.

PROBIOTIC-BASED SANITATION AS ALTERNATIVES TO CHEMICAL DISINFECTANTS 419

Instructions to Authors 425

Author index 428

Subject index 428

PROTECTIVE ACTIVITY OF ASCORBIC ACID AT INFLUENZA INFECTION

V.V. Zarubaev^a, A.V. Slita^a, I.N. Lavrentyeva^a, V.S. Smirnov^b

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

^b Cytomed, Ltd., St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Ascorbic acid (vitamin C, AA) is an essential nutrient of the human diet due to its participation on numerous regulatory and enzymatic processes. AA takes part in such vital physiological processes as hormone production, collagen synthesis, stimulation of the immune system, etc. In the present review the activities of AA are considered that provide its protective effect at influenza infection. This effect can be result of direct virus-inhibiting activity of AA as well as of anti-inflammatory and antioxidant properties. Oxidative stress during influenza infection leads to nonspecific damage of the pulmonary tissue and subsequent inflammation of the lungs. The antioxidant activity of AA results in alleviation of infection due to suppression of tissue damage as well as in inhibition of reactive oxygen species-mediated signal transduction and regulatory reactions. After oxidation by ROS, AA is converted to dehydroascorbic acid (DAA) and inhibits the key enzymes of NF- κ B pathway, such as kinases IKK α and IKK β . AA itself blocks the activity of another component of the NF- κ B pathway, kinase IKK β (SS/EE), whose activity is directed to the phosphorylation of the factor I κ B α . As a result, activation of NF- κ B and its transport to the nucleus does not occur. Thus, AA performs a dual function: first, it neutralizes free radicals, preventing them from activating NF- κ B, and secondly, the product of its oxidation, DAA, further blocks the activation of this pathway. In addition, in some cases AA results in the decrease in the infectious activity of influenza virus that is not due to the antioxidant activity of AA, but to direct virus-inhibiting activity. Taken together, the presented data suggests that the use of drugs with antiviral and antioxidant activity, as a combination of individual drugs or, as in the case of AA, as a single drug with complex activity, for treatment of influenza has advantages over the etiotropic drug monotherapy scheme.

Key words: vitamin C, ascorbic acid, influenza, antivirals, anti-inflammatory activity, antioxidant activity.

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Зарубаев В.В.¹, Слита А.В.¹, Лаврентьева И.Н.¹, Смирнов В.С.²

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

² ЗАО «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Аскорбиновая кислота (витамин С, АК) является важным пищевым компонентом для человека благодаря ее роли в различных регуляторных и ферментативных процессах. АК принимает участие в таких жизненно важных физиологических процессах, как продукция гормонов, синтез коллагена, стимуляция иммунной системы и пр. В настоящем обзоре рассмотрена активность АК, обеспечивающая ее протективный эффект при гриппозной инфекции. Этот эффект может быть обусловлен прямой вирусингибирующей активностью АК, а также ее противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. Окислительный стресс при гриппе ведет к неспецифическому повреждению ткани легких и развитию воспаления. Антиоксидантная активность АК приводит к облегчению течения инфекции вследствие снижения уровня повреждения ткани и ингибиро-

Адрес для переписки:

Зарубаев Владимир Викторович
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 911 928-04-95 (моб.).
E-mail: zarubaev@gmail.com

Contacts:

Vladimir V. Zarubaev
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 928-04-95 (mobile).
E-mail: zarubaev@gmail.com

Библиографическое описание:

Зарубаев В.В., Слита А.В., Лаврентьева И.Н., Смирнов В.С.
Протективная активность аскорбиновой кислоты при гриппозной
инфекции // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 319–326.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-319-326

Citation:

Zarubaev V.V., Slita A.V., Lavrentyeva I.N., Smirnov V.S. Protective activity
of ascorbic acid at influenza infection // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 319–326.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-319-326

вания передачи сигнала и регуляторных реакций, опосредуемых активными формами кислорода (АФК). После окисления АФК АК превращается в дегидроаскорбиновую кислоту (ДАК) и ингибирует ключевые ферменты сигнального пути NF-κB, такие как киназы IKKα и IKKβ. Сама АК блокирует активность другого компонента пути NF-κB — киназу IKKβ(SS/EE), активность которой направлена на фосфорилирование фактора IκBα. В результате активации NF-κB и его транспорта в ядро не происходит. Таким образом, АК осуществляет двойную функцию: во-первых, нейтрализует свободные радикалы, предотвращая активацию ими NF-κB, и, во-вторых, продукт ее окисления, ДАК, дополнительно блокирует активацию этого сигнального пути. Кроме того, в некоторых случаях АК приводит к снижению инфекционной активности вируса, что обусловлено не антиоксидантными свойствами АК, а ее прямой противовирусной активностью. Вместе взятые, представленные данные свидетельствуют, что использование препаратов с противовирусной и антиоксидантной активностью как в виде комбинации, так и, как в случае с АК, в виде единого препарата с комплексной активностью, для лечения гриппа имеет преимущества перед этиотропной схемой лечения гриппа монопрепаратами.

Ключевые слова: витамин С, аскорбиновая кислота, грипп, противовирусные препараты, противовоспалительная активность, антиоксидантная активность.

Ascorbic acid (vitamin C, AA, Fig.) is an important nutrient of the human diet, since it is not synthesized in the human body, similarly to guinea pigs and most primates. Other mammals (about 4000 species) are able to produce AA in the amount of about 50 mg/kg of body weight per day, or, in terms of human body, 5 g/day. This dose is sufficient to ensure the normal functioning of the body and resistance to infections [64].

Being a potent antioxidant [37, 46] and cofactor of many enzymes, AA takes part in such vital physiological processes as hormone production, collagen synthesis [6], stimulation of the immune system [16, 45, 63], etc. The long-term lack of vitamin C leads to scurvy, a pathological process caused primarily by a violation of collagen production and manifested in the destruction of blood vessels, disorders in the formation of bone tissue and attachment of the periosteum to the bones as well as loosening of teeth [21, 40]. In addition, a decrease in the level of collagen leads to a violation of the architectonics of the lung tissue, which causes primary pneumonia or provokes the development of secondary ones, which are the leading complication and the main cause of death in scurvy [28]. For many years, vitamin C has been considered as a key factor in the development of scurvy — a pathology of connective tissue. Indeed, in addition to the described symptoms, patients suffer from wound healing disorders and other pathologies that can be explained from this point of view. Therefore, the role of vitamin C was mainly, if not exclusively, attributed to the maintenance of the integrity of the connective tissue, despite numerous observations of the effect of AA on the course of infectious processes as well [25].

Along with this, however, ascorbic acid has a range of other biological activities. In particular, it is shown that it plays an important role in epigenetic regulation, being in the form of ascorbate anion a co-factor of methylcytosine dioxygenase, an enzyme responsible for DNA demethylation. In addition, AA is also a cofactor of enzymes that carry out methylation of histones, which also provides

epigenetic regulation of gene activity, in particular by changing the concentration and bioavailability of AA in different sites of organs and tissues. This activity is important in the development of pathologies such as neurodegenerative and oncological diseases in the absence of AA [10].

Among many types of biological activity of AA, its ability to inhibit the reproduction of viruses from a wide variety of families and phylogenetic groups should be specially noted. In the XIX–XX centuries, AA was used to treat hepatitis, encephalitis, influenza, SARS and some other viral infections. In 1970, Pauling's book «Vitamin C and Common Cold» was published, where a favorable effect of high doses of AA as a mean of preventing and treating ARI was proved [47].

The effect of AA on the course of a viral infection can be explained by several factors. First, being an antioxidant, AA has a neutralizing effect on one of the leading factors of the pathogenesis of a viral infection — the free radicals formed by inflammation and the oxidative stress caused by them. Secondly, many viruses use free radicals as regulators of their own reproduction and signaling cascades during the viral cycle. The inhibition of the formation of free radicals using AA, therefore, has an indirect inhibitory effect on the replication and spread of viruses. Finally, AA, in some cases, acts independently of antioxidant activity, suppressing viral reproduction directly, i.e. as an etiotropic agent, albeit of low efficiency.

Below we describe each of the mechanisms of AA activity in viral infections separately. Prior to describing the activity of AA in viral pathology, we will consider the pathological process itself in terms of balance between pro- and antioxidant factors.

The term «free radicals» (FR) means molecules containing one or more unpaired electrons at the upper electronic level, as well as molecules that possess high reactivity in biological systems and in the absence of such unpaired electrons. Examples of FR include molecular oxygen O₂, superoxide radical O₂^{•-}, hydroxyl radical OH⁻, nitrogen oxide NO, hydrogen peroxide H₂O₂, peroxy nitrite ONOO⁻, etc. reactive

oxygen species (ROS) and active forms of nitrogen (AFN) are produced both in normal physiological conditions, and in pathological ones. Among them, O_2 and NO are the key intermediates in infectious processes. They play an important role in the transfer of intercellular signal transduction, the regulation of cytokine production, growth and transcription factors, immunomodulation and apoptosis processes, etc. [11].

However, many pathogens in the course of the infectious process lead to the activation of phagocytes and neutrophils, which produce ROS, which is accompanied by the production of excessive FR. In organism, ROS serve to inactivate viruses, destroy bacteria and remove cell decay products, as well as regulate apoptosis, i.e. to normalize the state of the organism, eliminate pathogens and maintain homeostasis. However, with the propagation of the pathogen, more FR is produced, which leads to a shift in the redox balance. In view of their low selectivity, ROS are one of the main factors in the pathogenesis of many acute infections, resulting in DNA damage, lipids and proteins destruction, loss of integrity of healthy cells, excessive and inadequate damage to the tissue architectonics and functions of the target organ [1, 48]. In addition, under such conditions, transcription factors such as NF- κ B, which in some cases are proviral [55], are activated, as we will discuss below. The suppression of these processes, therefore, should be considered as a method of protecting tissue in the foci of inflammation and general protection in the course of infectious processes. To maintain a balance between oxidative and antioxidant processes in the tissue, there is an antioxidant defense system, represented by an enzymatic and non-enzymatic species. The first include enzymes of metabolism of ROS, like catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase, neutralizing, in particular, $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 . The second group is represented by organic antioxidants — vitamins C and E, polyphenols, carotenoids, etc.

Suppression of virus reproduction due to antioxidant activity

The disturbance of the oxidant-antioxidant balance leads to oxidative stress, the formation of which has been proved today for the vast majority of acute viral infections. This was first shown for the Sendai virus model and mouse splenocytes, which enhance the production of FR in response to contact with the virus, not only intact, but also inactivated by ultraviolet irradiation [49]. Later the increase of oxidative activity in cells leading to their death was shown for many viruses, both RNA and DNA genomic [44, 50, 52].

FR and lipid peroxidation products affect the reproduction of viruses by regulating cell activity, the inflammatory and immune response in general,

as well as damaging the components of the virus and the host cell. Destruction of infected and neighboring target cells can limit the spread of the virus. However, in general, it is not completely understood how much the benefit of such destruction exceeds, if at does, its negative consequences. Thus, it is known that oxidative stress promotes the replication of RNA-genome alpha- and flaviviruses [20], and that the use of antioxidants significantly inhibits this process by violating the capping of virus-specific mRNAs. Similarly, oxidative stress contributes to the reproduction of human papillomavirus at several stages [62]. Data on the hepatitis C virus, however, are contradictory: there is evidence of both the inhibitory effect of oxidative stress on viral reproduction and the inhibitory properties of antioxidants [11].

Viruses affect the oxidant-antioxidant balance of the host, increasing the concentration of oxidizing components (peroxides and nitric oxide) and reducing the production of antioxidant enzymes such as SOD, catalase, etc. Thus, oxidative stress affects various aspects of the pathogenesis of viral infections, and the use of antioxidants also can affect the course of the virus-induced pathological process by different ways.

Protective activity in tissue and pathogenetic activity

Oxidative stress during influenza infection leads to nonspecific damage of the pulmonary tissue and subsequent inflammation of the lungs [2, 13]. FR, such as a peroxide radical and nitric oxide, are released into the extracellular space by inflammatory cells (activated neutrophils, producing an order of magnitude greater FR than resting neutrophils) and respiratory epithelial cells. Accumulation of neutrophils in the alveoli leads to the accumulation of FR, proteases and products of lipid peroxidation. Damage of pulmonary tissue at influenza is thus provided by two mechanisms — direct viral cytotoxicity and toxic effects in case of excessive inflammation. Obviously, the last of these mechanisms can be neutralized with antioxidants. Among the compounds of this group, AA is optimal because of its effectiveness, low toxicity, high solubility and bioavailability, and higher stability compared to, for example, glutathione.

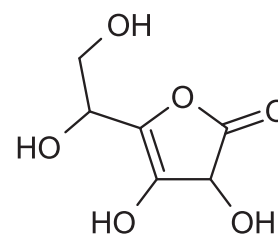


Figure. Ascorbic acid

Hennet T. et al. have shown that concentration of the main antioxidants, glutathione and vitamins C and E, decreases in blood plasma, lungs and liver after influenza infecting [27]. This phenomenon increases the susceptibility of the organism to other damaging factors, not necessarily even of an infectious nature.

The effect of glutathione on the course of influenza infection in cell culture was also studied [8]. As a result of the experiments, it was shown that in the presence of glutathione, the infectious activity of the virus, as well as the expression of the M1 virus protein and the activity of apoptotic processes, the virus-induced activation of proapoptotic caspase (caspase 3), were decreased. This was accompanied by inhibition of virus-induced activation of the surface «death receptor» Fas.

Introduction of glutathione into drinking water of influenza-infected mice was shown to inhibit production of the virus in lung tissue and trachea, suggesting the proviral role of oxidative processes in the tissues in the course of influenza infection. The damaging effects of innate immune factors such as inflammatory cytokines, TLR-4 and TLR-7, NF- κ B, as well as the level of tissue infiltration of inflammatory cells in influenza could be prevented by an antioxidant catalase enzyme [56].

Thus, the disturbance of the oxidation-antioxidant balance in influenza infection plays a dual role in the pathogenesis of influenza. On the one hand, an increase in the concentration of FR leads to nonspecific damage to the target tissue. On the other hand, it contributes to the reproduction of the virus, which further activates the infectious process.

It is known that influenza infection in mice leads to a decrease in vitamin C content in bronchopulmonary lavage [7], and vitamin C deficiency leads to a significant increase in the degree of lung pathology [38]. Similarly, infection with the respiratory syncytial virus leads to a decrease in the production of antioxidant enzymes and, as a consequence, to an increase in the oxidative damage of cells in the respiratory system [29].

An increase in the level of oxidative processes during infection explains the decrease in the level of AA as a compound, primarily exposed to ROS. For example, in the plasma of patients with symptoms of acute respiratory viral infection, the AA content is half that of normal people and returns to normal after recovery. It was shown that a decrease in the level of AA in acute respiratory viral infections (ARVI) can be neutralized by taking 6 g of vitamin C per day [31].

Possible mechanisms of action of AA at influenza have been studied by Cai Y. et al. [9]. It is known that at the level of the whole organism influenza infection leads to stress that is accompanied by the production of glucocorticoid hormones. Their increased amount leads to increase in the level of lipid peroxidation and the release of ROS from the mitochondria. It is shown

that AA inhibits both the synthesis of glucocorticoids themselves and the intensity of oxidative processes induced by them, thereby reducing the susceptibility of animals to influenza under stress.

On the model of liver immune damage [39], it was shown that the use of AA significantly reduces the level of the main inflammatory mediators — IFN γ , IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , as well as inflammatory factors such as cyclooxygenase COX-2 and inducible NO-synthetase iNOS and NF- κ B. Given that all of these factors are universal mediators of inflammation, it can be assumed that in the case of influenza infection this mechanism of AA activity also takes place.

In addition to the protective activity of AA due to its antioxidant properties, this vitamin C possesses the properties of immunomodulator. First of all, it concerns the factors of innate immunity, which drive the development of inflammatory reaction. For example, important data on the mechanism of AA activity were obtained by Tan P.H. et al. [58]. It has been demonstrated that the AA treatment significantly affects the properties of dendritic cells reducing their sensitivity to pro-inflammatory cytokines. Moreover, acting as regulatory factors, such cells induce anergy in T cells, making them tolerant to antigenic stimulation.

Similar results were obtained in the course of analysis of the production of inflammatory factors after stimulation of neural cells in culture [30]. Incubation with bacterial lipopolysaccharide led to the activation of the synthesis of nitric oxide and the expression of inflammatory mediators — iNOS, IL-6 and MIP-2, and also suppressed the nuclear translocation of the main inflammatory trigger factor NF- κ B. In cells of endothelial origin, AA inhibited the activation of NF- κ B in response to various stimuli, such as IL-1 and TNF. It is important that along with redox-dependent signal transduction systems, treatment with ascorbic acid also inhibited redox-independent pathways of NF- κ B activation. Detailed studies for identifying a specific AA target allowed to establish that MAP-kinase p38 [5] is affected, at least by high concentrations of AA. Using gene-knockout mice defective in the Gulo gene, which provides the biosynthesis of AA in mice, Bae S. et al. [3] showed that, at toxic liver damage, the levels of proinflammatory cytokines (TNF α and IFN γ), as well as the intensity of apoptosis of hepatocytes and inflammatory liver infiltration, were significantly increased in these mice compared to controls. When infected with the influenza virus, despite the same level of reproduction of the virus in the lungs comparing to control animals, they demonstrated much advanced lung tissue damage and increased levels of influenza-specific cytokines, such as RANTES, IL-1 β and TNF α , as well as the factor NF- κ B, on early stages of the disease. In contrast, on late stages the levels of RANTES, MCP-1 and IL-12 were lower than in control mice [38]. In another similar

study [36], it was shown that viral activity in the lung tissue of Gulo (–/–) mice was increased in the absence of AA, and the production of the antiviral cytokine IFN α/β was lower than in animals receiving AA. The level of cellular infiltration and the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF α and IL-1 α/β in lung tissue, were increased. In general, the results obtained indicate that vitamin C provides an antiviral immune response *in vivo* by activating the synthesis of IFN α/β .

Special attention should be paid to the influence of AA on the key components of inflammation. Thus, ROS along with pro-inflammatory cytokines (TNF α), hydrogen peroxide and many other factors activate the transcription factor NF- κ B, which plays an important role in cell defense, inflammation and apoptosis [4]. In inactive form, NF- κ B is bound to the regulatory protein I κ B and localized in the cytoplasm. These factors activate the cellular kinases IKK α and IKK β , which carry out the phosphorylation of I κ B. After phosphorylation it dissociates from NF- κ B and degrades in proteasomes, whereas NF- κ B itself in free form can be translocated from the cytoplasm into the cell nucleus where it activates the genes of the inflammatory cascade.

Important data were obtained by studying the role of AA in this process. After oxidation in reaction with ROS, AA is converted to dehydroascorbic acid (DAA). It was shown that DAA inhibits the key enzymes of NF- κ B pathway, such as kinases IKK α and IKK β , whereas the AA itself does not possess this ability. AA, however, blocked the activity of another component of the NF- κ B pathway, kinase IKK β (SS/EE), whose activity is directed to the phosphorylation of the factor I κ B α . Importantly, the inhibition of IKK α and IKK β kinase activity by DAA is specific, since the activity of, for example, p38 MAP kinase, was only slightly reduced in the presence of very high DAA concentration (0.5 mM). As a result of inhibition of IKK α and IKK β kinases, activation of NF- κ B and its transport to the nucleus does not occur. Thus, AA performs a dual function: first, it neutralizes free radicals, preventing them from activating NF- κ B, and secondly, the product of its oxidation, DAA, further blocks the activation of this pathway. It is believed that the suppression of the enzymatic activity of kinases occurs when the DAA is linked to their active sites and the binding or catalysis is blocked with ATP or substrate, since the addition of excess of ATP partially removed the inhibitory effect of DAA [12]. Thus, the effect of AA is based on the inhibition of kinase processes regulating the activity of the main signaling pathway of inflammation NF- κ B.

Another mechanism of protective activity of AA in inflammation was studied on the model of sepsis in Gulo (–/–) mice. It is known that one of the mechanisms of pathogens inactivation in the body is the formation of so-called neutrophil extracellular

traps (NET), when DNA released from destroyed neutrophils binds virus particles and bacterial cells. The number of such traps in mice incapable of synthesizing AA was significantly higher in sepsis than in control animals. Other sepsis-specific processes in neutrophils, such as autophagy, endoplasmic stress, histone modification, were also activated. All these indicators, however, returned to normal values after AA application [43].

In a patient with acute respiratory distress syndrome, signs of pathology were removed by intravenous administration of high dose vitamin C, 200 mg/kg/day [17]. Similarly, the pain syndrome and the inflammatory response in a patient with Chikungunya fever [19] were eliminated for 2 days. Taken together, the above data indicate the important role of AA as a regulator of the inflammatory process in the body.

Concerning the use of AA at influenza, it should be said that several studies suggest that the suppression of viral reproduction requires its relatively high concentration (5 mM), which in terms of the human body is about 4.4 grams per day. Obviously, the doses used do not allow this mechanism of activity to be realized. To increase the efficiency of absorption and taking into account that the dose of AA higher than 1 g/day can lead to side effects, for the therapeutic effect is recommended not oral but intravenous route of administration. At the same time, a sharp abolition of AA after therapy can mimic its deficiency and lead, therefore, to the development of scurvy symptoms. All this should be considered when prescribing vitamin C for the purpose of treating the flu. Nevertheless, the available data indicate the undoubted therapeutic effect of AA as a means of minimizing cell death — one of the leading pathogenetic factors in influenza, including highly pathogenic avian influenza H5N1 [64].

Direct antiviral activity of ascorbic acid

Speaking about the direct antiviral effect of AA, first of all human immunodeficiency virus should be mentioned. It is shown that clinical effectiveness of antiretroviral therapy rises sharply with AA consumption. It is important that AA in this case does not work as a specific antiviral drug, but inhibits viral reproduction due to its antioxidant properties inhibiting ROS that play an essential role in signal transduction and control of gene expression [24, 41]. Suppression of HIV replication occurs through transcription factors NF- κ B, AP-1 and USF, whose activity is suppressed by antioxidants [22, 32, 53]. Nevertheless, there is evidence that AA suppresses reproduction of HIV directly by blocking the regulation of viral reproduction at the stage of Tat-dependent elongation of the viral genome. It was shown that the degree of this suppression was not accompanied by a decrease in the activity of the main transcription factors — RNA polymerase II, NF- κ B, S-1 and USF factors [23].

It was also shown that the intravenous use of AA in patients infected with the Epstein–Barr virus led to a decrease in the duration of the disease, as well as an increase in the titer of specific antibodies [42].

As early as 1978, clinical tests demonstrated that using high doses of vitamin C (1 g per day) in combination with bioflavonoids, the duration of pain caused by herpes infection (herpes labialis) decreased from 3.1 to 1.3 days. Moreover, with the onset of AA administration 24 hours after the onset of symptoms of herpes, only 6 of 26 patients (23%) reported the development of specific vesicles, whereas at the late start of treatment they were formed in 8 of 12 patients (67%). Obtained results, of course, do not directly indicate the role of AA, since flavonoids were involved in the study. No evidence exists, nevertheless, of their effect on herpetic infection, so the described clinical effect might be attributed to vitamin C.

In cell cultures, ascorbic acid suppresses the reproduction of the influenza virus [34]. At the same time, its reduced form, dehydroascorbic acid, which does not exhibit antioxidant properties, exhibits much higher antiviral activity compared to AA. Consequently, as in the described case with HIV, the decrease in the infectious activity of the virus is not due to the antioxidant activity of AA, but to other characteristics [18].

In clinical trials involving 226 patients diagnosed with influenza A, the effect of AA on the incidence of complications in the form of pneumonia and the length of stay in the hospital were studied. Among the control group, 10 of 112 patients developed pneumonia, whereas among patients receiving 300 mg of AA daily, only 2 out of 114. The length of stay in the hospital was 12 days in the control group and 9 days in the experimental group. Thus, the use of AA contributes to reducing the severity of influenza in patients (Banerjee, 2010).

In general, the use of AA at influenza has been the subject of active study and discussion for 70 years [26]. The latest Cochrane review of the effectiveness of the use of AA in respiratory pathologies of about 11 thousand people did not reveal significant differences between the control and the experimental group in terms of the incidence rate. Nevertheless, it has been shown that the systematic use of vitamin C, although not in all the clinical studies reviewed, reduces the duration and severity of common cold symptoms.

In conclusion, the use of drugs with antiviral and antioxidant activity, as a combination of individual drugs or, as in the case of AA, as a single drug with complex activity, for treatment of influenza has advantages over the etiotropic drug monotherapy scheme [60].

References

1. Akaike T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev. Med. Virol.*, 2001, vol. 11, iss. 2, pp. 87–101. doi: 10.1002/rmv.303
2. Akaike T., Noguchi Y., Ijiri S., Setoguchi K., Suga M., Zheng Y.M., Dietzschold B., Maeda H. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, no. 6, pp. 2448–2453.
3. Bae S., Cho C.H., Kim H., Kim Y., Kim H.R., Hwang Y.I., Yoon J.H., Kang J.S., Lee W.J. In vivo consequence of vitamin C insufficiency in liver injury: vitamin C ameliorates T-cell-mediated acute liver injury in Gulo (-/-) mice. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, vol. 19, iss. 17, pp. 2040–2053. doi: 10.1089/ars.2012.4756
4. Baeuerle P.A., Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, pp. 141–179. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001041
5. Bowie A.G., O'Neill L.A. Vitamin C inhibits NF- κ B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, iss. 12, pp. 7180–7188. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7180
6. Boyera N., Galey I., Bernard B.A. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 1998, vol. 20, iss. 3, pp. 151–158. doi: 10.1046/j.1467-2494.1998.171747.x
7. Buffinton G.D., Christen S., Peterhans E., Stocker R. Oxidative stress in lungs of mice infected with influenza A virus. *Free Radic. Res. Commun.*, 1992, vol. 16, iss. 2, pp. 99–110. doi: 10.3109/10715769209049163
8. Cai J., Chen Y., Seth S., Furukawa S., Compans R.W., Jones D.P. Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, vol. 34, iss. 7, pp. 928–936. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00023-6
9. Cai Y., Li Y.F., Tang L.P., Tsoi B., Chen M., Chen H., Chen X.M., Tan R.R., Kurihara H., He R.R. A new mechanism of vitamin C effects on A/FM/1/47(H1N1) virus-induced pneumonia in restraint-stressed mice. *Biomed Res. Int.*, 2015, vol. 2015, 12 p. doi: 10.1155/2015/675149
10. Camarena V., Wang G. The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016, vol. 73, iss. 8, pp. 1645–1658. doi: 10.1007/s00018-016-2145-x
11. Camini F.C., da Silva Caetano C.C., Almeida L.T., de Brito Magalhães C.L. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch. Virol.*, 2017, vol. 162, iss. 4, pp. 907–917. doi: 10.1007/s00705-016-3187-y
12. Cárcamo J.M., Pedraza A., Bórquez-Ojeda O., Zhang B., Sanchez R., Golde D.W. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I κ B α kinase β . *Mol. Cell. Biol.*, 2004, vol. 24, no. 15, pp. 6645–6652. doi: 10.1128/mcb.24.15.6645-6652.2004
13. Choi A.M., Knobil K., Otterbein S.L., Eastman D.A., Jacoby D.B. Oxidant stress responses in influenza virus pneumonia: gene expression and transcription factor activation. *Am. J. Physiol.*, 1996, vol. 271, no. 3, pp. L383–L391.
14. Coates B.M., Staricha K.L., Wiese K.M., Ridge K.M. Influenza A virus infection, innate immunity, and childhood. *JAMA Pediatr.*, 2015, vol. 169, no. 10, pp. 956–963. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.1387
15. Hemilä H., Chalker E., Douglas B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2007, no. 3, CD000980. doi: 10.1002/14651858.CD000980.pub3

16. Englund S., Seifert S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann. Rev. Nutr.*, 1986, vol. 6, pp. 365–406. doi: 10.1146/annurev.nu.06.070186.002053
17. Fowler III A.A., Kim C., Lepler L., Malhotra R., Debesa O., Natarajan R., Fisher B.J., Syed A., DeWilde C., Priday A., Kasi-rajana V. Intravenous vitamin C as adjunctive therapy for enterovirus/rhinovirus induced acute respiratory distress syndrome. *World J. Crit. Care Med.*, 2017, vol. 6, iss. 1, pp. 85–90. doi: 10.5492/wjccm.v6.i1.85
18. Furuya A., Uozaki M., Yamasaki H., Arakawa T., Arita M., Koyama A.H. Antiviral effects of ascorbic and dehydroascorbic acids in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, 2008, vol. 22, iss. 4, pp. 541–545. doi: 10.3892/ijmm_00000053
19. Gonzalez M.J., Miranda-Massari J.R., Berdiel M.J., Duconge J., Rodríguez-López J.L., Hunninghake R., Cobas-Rosario V.J. High dose intravenous vitamin C and chikungunya fever: a case report. *J. Orthomol. Med.*, 2014, vol. 29, iss. 4, pp. 154–156.
20. Gullberg R.C., Steel J.J., Moon S.L., Soltani E., Geiss B.J. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology*, 2015, vol. 475, pp. 219–229. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.037
21. Hampl J.S., Taylor C.A., Johnston C.S. Vitamin C deficiency and depletion in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. *Am. J. Public Health*, 2004, vol. 94, no. 5, pp. 870–875. doi: 10.2105/ajph.94.5.870
22. Harakeh S., Jariwalla R.J. Comparative study of the anti-HIV activities of ascorbate and thiol-containing reducing agents in chronically HIV-infected cells. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, vol. 54, suppl. 6, pp. 1231S–1235S.
23. Hayashi T. Preventive effect of ascorbic acid against biological function of human immunodeficiency virus trans-activator of transcription. *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, 2016, vol. 5, iss. 2, pp. 205–209. doi: 10.5455/jice.20160316010322
24. Hayashi T., Ueno Y., Okamoto T. Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 15, pp. 11380–11388.
25. Hemilä H. Vitamin C and infections. *Nutrients*, 2017, vol. 9, iss. 4: 339. doi: 10.3390/nu9040339
26. Hemilä H., Chalker E. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2013, iss. 1, CD000980. doi: 10.1002/14651858.CD000980.pub4
27. Hennet T., Peterhans E., Stocker R. Alterations in antioxidant defences in lung and liver of mice infected with influenza A virus. *J. Gen. Virol.*, 1992, no. 73, pp. 39–46. doi: 10.1099/0022-1317-73-1-39
28. Hess A.F. Scurvy, Past and Present. *Philadelphia, USA: J.B. Lippincott Company, Washington Square Press, 1920, 261 p.*
29. Hosakote Y.M., Jantzi P.D., Esham D.L., Spratt H., Kurosky A., Casola A., Garofalo R.P. Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, vol. 183, no. 11, pp. 1550–1560. doi: 10.1164/rccm.201010-1755OC
30. Huang Y.N., Lai C.C., Chiu C.T., Lin J.J., Wang J.Y. L-ascorbate attenuates the endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation and NF- κ B translocation in cortical neurons/glia Cocultures. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 7: e97276. doi: 10.1371/journal.pone.0097276
31. Hume R., Weyers E. Changes in leucocyte ascorbic acid during the common cold. *Scott. Med. J.*, 1973, vol. 18, iss. 1, pp. 3–7. doi: 10.1177/003693307301800102
32. Israël N., Gougerot-Pocidalo M.A., Aillet F., Virelizier J.L. Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kappa B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines. *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, iss. 10, pp. 3386–3393.
33. Iwasaki A., Pillai P.S. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, vol. 14, pp. 315–328. doi: 10.1038/nri3665
34. Jariwalla R.J., Roomi M.W., Gangapurkar B., Kalinovsky T., Niedzwiecki A., Rath M. Suppression of influenza A virus nuclear antigen production and neuraminidase activity by a nutrient mixture containing ascorbic acid, green tea extract and amino acids. *BioFactors*, 2007, vol. 31, iss. 1, pp. 1–15. doi: 10.1002/biof.5520310101
35. Kim H., Jang M., Kim Y., Choi J., Jeon J., Kim J., Hwang Y.I., Kang J.S., Lee W.J. Red ginseng and vitamin C increase immune cell activity and decrease lung inflammation induced by influenza A virus/H1N1 infection. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2016, vol. 68, iss. 3, pp. 406–420. doi: 10.1111/jphp.12529
36. Kim Y., Kim H., Bae S., Choi J., Lim S.Y., Lee N., Kong J.M., Hwang Y.I., Kang J.S., Lee W.J. Vitamin C is an essential factor on the anti-viral immune responses through the production of interferon- α/β at the initial stage of influenza A virus (H3N2) infection. *Immune Netw.*, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 70–74. doi: 10.4110/in.2013.13.2.70
37. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 2004, vol. 11, iss. 8, pp. 1041–1064. doi: 10.2174/0929867043455567
38. Li W., Maeda N., Beck M.A. Vitamin C deficiency increases the lung pathology of influenza virus-infected Gulo-/- mice. *J. Nutr.*, 2006, vol. 136, no. 10, pp. 2611–2616.
39. Liang T., Chen X., Su M., Chen H., Lu G., Liang K. Vitamin C exerts beneficial hepatoprotection against Concanavalin A-induced immunological hepatic injury in mice through inhibition of NF- κ B signal pathway. *Food Funct.*, 2014, vol. 5, iss. 9, pp. 2175–2182. doi: 10.1039/c4fo00224e
40. Lykkesfeldt J., Michels A.J., Frei B. Vitamin C. *Adv. Nutr.*, 2014, vol. 5, pp. 16–18. doi: 10.3945/an.113.005157
41. Meyer M., Pahl H.L., Baeuerle P.A. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem. Biol. Interact.*, 1994, vol. 91, no. 2–3, pp. 91–100.
42. Mlkirova N., Hunninghake R. Effect of high dose vitamin C on Epstein–Barr viral infection. *Med. Sci. Monit.*, 2014, vol. 20, pp. 725–732. doi: 10.12659/msm.890423
43. Mohammed B.M., Fisher B.J., Kraskauskas D., Farkas D., Brophy D.F., Fowler A.A., Natarajan R. Vitamin C: a novel regulator of neutrophil extracellular trap formation. *Nutrients*, 2013, vol. 5, iss. 8, pp. 3131–3151. doi: 10.3390/nu5083131
44. Muller F. Reactive oxygen intermediates and human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Free Radic. Biol. Med.*, 1992, vol. 13, iss. 6, pp. 651–657. doi: 10.1016/0891-5849(92)90039-J
45. Noh K., Lim H., Moon S.-K., Kang J.S., Lee W.J., Lee D., Hwang Y.I. Mega-dose Vitamin C modulates T cell functions in Balb/c mice only when administered during T cell activation. *Immunol. Lett.*, 2005, vol. 98, no. 1, pp. 63–72. doi: 10.1016/j.imlet.2004.10.012

46. Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Shenglin C., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003, vol. 22, iss. 1, pp. 18–35. doi: 10.1080/07315724.2003.10719272
47. Pauling L. Vitamin C and the Common Cold. *San Francisco, CA: W.H. Freeman and Company*, 1970, 122 p.
48. Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. *J. Nutr.*, 1997, vol. 127, no. 5, pp. 962S–965S.
49. Peterhans E. Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, vol. 91, pp. 383–392. doi: 10.1016/0006-291X(79)90630-2
50. Peterhans E., Grob M., Burge T., Zanoni R. Virus-induced formation of reactive oxygen intermediates in phagocytic cells. *Free Radic. Res. Commun.*, 1987, vol. 3, iss. 1–5, pp. 39–46. doi: 10.3109/10715768709069768
51. Qiao H., May J.M. Macrophage differentiation increases expression of the ascorbate transporter (SVCT2). *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, vol. 46, iss. 8, pp. 1221–1232. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.004
52. Reshi M.L., Su Y.-C., Hong J.-R. RNA viruses: ROS-mediated cell death. *Int. J. Cell. Biol.*, 2014, 16 p. doi: 10.1155/2014/467452
53. Roederer M., Staal F.J., Raju P.A., Ela S.W., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, no. 12, pp. 4884–4888. doi: 10.1073/pnas.87.12.4884
54. Sasazuki S., Sasaki S., Tsubono Y., Okubo S., Hayashi M., Tsugane S. Effect of vitamin C on common cold: randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2006, vol. 60, pp. 9–17. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602261
55. Schwarz K.B. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, vol. 21, iss. 5, pp. 641–649.
56. Shi X., Shi Z., Huang H., Zhu H., Zhou P., Zhu H., Ju P. Ability of recombinant human catalase to suppress inflammation of the murine lung induced by influenza A. *Inflammation*, 2014, vol. 37, iss. 3, pp. 809–817. doi: 10.1007/s10753-013-9800-2
57. Son E.W., Mo S.J., Rhee D.K., Pyo S. Vitamin C blocks TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in human neuroblastoma cells. *Arch. Pharm. Res.*, 2004, vol. 27, iss. 10: 1073.
58. Tan P.H., Sagoo P., Chan C., Yates J.B., Campbell J., Beutelspacher S.C., Foxwell B.M., Lombardi G., George A.J. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, iss. 12, pp. 7633–7644. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.7633
59. Terezhalmay G.T., Bottomley W.K., Pelleu G.B. The use of water-soluble bioflavonoid-ascorbic acid complex in the treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1978, vol. 45, iss. 1, pp. 56–62.
60. Uchide N., Toyoda H. Antioxidant therapy as a potential approach to severe influenza-associated complications. *Molecules*, 2011, vol. 16, iss. 3, pp. 2032–2052. doi: 10.3390/molecules16032032
61. Wang H., Xu R., Shi Y., Si L., Jiao P., Fan Z., Han X., Wu X., Zhou X., Yu F., Zhang Y., Zhang L., Zhang L., Zhou D., Xiao S. Design, synthesis and biological evaluation of novel L-ascorbic acid-conjugated pentacyclic triterpene derivatives as potential influenza virus entry inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, vol. 110, pp. 376–388. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.005
62. Williams V.M., Filippova M., Soto U., Duerksen-Hughes P.J. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. 45–57. doi: 10.2217/fvl.10.73
63. Wintergerst E.S., Maggini S., Hornig D.H. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann. Nutr. Metab.*, 2006, vol. 50, suppl. 2, pp. 85–94. doi: 10.1159/000090495
64. Yuan S. Drugs to cure avian influenza infection-multiple ways to prevent cell death. *Cell Death Dis.*, 2013, 4: e835. doi: 10.1038/cddis.2013.367

Авторы:

Зарубаев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Слита А.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии 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;
Смирнов В.С., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Zarubaev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Slita A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, 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;
Smirnov V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, CJSC MBSIK "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.05.2017
 Принята к печати 02.10.2017

Received 22.05.2017
 Accepted 02.10.2017

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ И РОЛЬ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Савченко^{1,2}, И.В. Кудрявцев^{3,4}, А.Г. Борисов^{1,2}

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

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

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В свете современных представлений респираторный взрыв, напрямую связанный с процессами фагоцитоза, характеризует функциональную активность фагоцитирующих клеток. В данном обзоре представлены современные методы оценки состояния респираторного взрыва фагоцитов, основанные на цитофлюориметрическом и хемилюминесцентном анализе. Подробно представлены последовательность и механизмы реакций синтеза активных форм кислорода (АФК) в процессе респираторного взрыва клеток. Охарактеризована последовательность синтеза от АФК с низкой бактерицидной активностью к АФК с высокой бактерицидной активностью. В обзоре подробно описаны наиболее популярные красители для цитофлюориметрического анализа для оценки уровней синтеза АФК. Приводятся характеристики и примеры применения таких красителей, как дигидроэтидин, дихлородигидрофлуоресцеин и дигидрородамин 123. Представлены основные этапы и механизмы хемилюминесцентной реакции. Описаны особенности применения основных индикаторов (люминол и люцигенин) хемилюминесцентной реакции. Приводится механизм оценки показателей хемилюминесцентной реакции, характеризующие особенности состояния и кинетики респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Отдельный раздел обзора посвящен роли респираторного взрыва фагоцитирующих клеток при различных иммунопатологических состояниях. Представлены данные литературы о патогенетическом значении изменения интенсивности и кинетики респираторного взрыва фагоцитов при инфекционных, воспалительных и онкологических заболеваниях. Приводятся примеры новых методов диагностики и прогноза характера течения иммунопатологических состояний на основе оценки респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Данные литературы показывают, что в настоящее время при диагностике и оценке характера течения заболеваний состояние респираторного взрыва определяется у различных типов клеток врожденного иммунитета: нейтрофилы, моноциты и т. д. Делается заключение о том, что оценка респираторного взрыва фагоцитирующих клеток позволяет охарактеризовать как фундаментальные механизмы реагирования клеток врожденного иммунитета на патогенные и регуляторные воздействия, так разрабатывать новые высокочувствительные методы диагностики и прогноза развития и исхода различных иммунопатологических состояний.

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., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 327–340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340

Citation:

Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 327–340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340

тологических состояний. Представленные методы проточной цитометрии и хемилюминесцентного анализа позволяют определять как интегральное состояние респираторного взрыва, так и уровни и кинетические параметры синтеза отдельных АФК.

Ключевые слова: респираторный взрыв, фагоцитирующие клетки, нейтрофилы, моноциты, активные формы кислорода, супероксид-радикал, инфекционно-воспалительные заболевания.

METHODS OF ESTIMATION AND THE ROLE OF RESPIRATORY BURST IN THE PATHOGENESIS OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES

Savchenko A.A.^{a,b}, Kudryavtsev I.V.^{c,d}, Borisov A.G.^{a,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. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Abstract. According to the modern concepts the respiratory burst directly related to the processes of phagocytosis characterizes the functional activity of phagocytic cells. This review presents modern methods for assessing the respiratory burst state of phagocytes based on cytofluorometric and chemiluminescent analysis. The sequence and mechanisms of the reactions of reactive oxygen species (ROS) synthesis in the process of respiratory cell burst are presented in detail. The sequence of synthesis from ROS with low bactericidal activity to ROS with high bactericidal activity is characterized. The review describes in detail the most popular dyes for cytofluorometric analysis to assess the levels of ROS synthesis. Characteristics and examples of the use of such dyes as dihydroethidine, dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are given. The main stages and mechanisms of the chemiluminescence reaction are presented. The features of the use of the main indicators (luminol and lucigenin) of the chemiluminescence reaction are described. A mechanism for estimating the parameters of the chemiluminescence reaction characterizing the features of the state and kinetics of the respiratory burst of phagocytic cells is given. The separate section of the review is devoted to the role of a respiratory burst in phagocytic cells in various immunopathological states. Data on the pathogenetic significance of changes in the intensity and kinetics of respiratory burst of phagocytes in infectious, inflammatory and oncological diseases were presented. Examples of new methods for diagnosing and predicting the course of the immunopathological states characters are presented on the basis of an assessment of the respiratory burst of phagocytic cells. The literature data show that at present, in the diagnosis and evaluation of the nature of the diseases characters the state of a respiratory burst is evaluated in various types of cells of innate immunity: neutrophils, monocytes, etc. It is concluded that the evaluation of the respiratory burst of phagocytic cells can be characterized as the fundamental mechanisms of reacting cells of innate immunity to pathogenic and regulatory effects, so to develop new highly sensitive methods for diagnosing and predicting the development and outcome of various immunopathological conditions. The presented methods of flow cytometry and chemiluminescence analysis make it possible to determine both the integral state of the respiratory explosion, and the levels and kinetic parameters of the synthesis of individual ROS.

Key words: respiratory burst, phagocytic cells, neutrophils, monocytes, active oxygen species, superoxide radical, infectious and inflammatory diseases.

Введение

Одним из древнейших механизмов иммунной защиты, возникшим на самых ранних этапах эволюции живых организмов, является фагоцитоз [21]. Впервые явление фагоцитоза (от греч. «phagos» — пожирающий и «cytos» — клетка) было открыто и изучено И.И. Мечниковым (1882). Он установил, что фагоцитоз — это врожденная реакция организма, проявляющаяся в способности клеток-фагоцитов захватывать, проникающие в тело животного, инородные частицы с последующим их перевариванием [35]. Фагоцитирующие клетки в организме человека и животных представлены двумя типами. Во-первых, это полиморфно-ядерные

лейкоциты, из которых нейтрофильные гранулоциты являются основными эффекторными клетками острого воспаления. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [10]. И, во-вторых, это клетки макрофагально-фагоцитарной системы, в которую, кроме моноцитов и макрофагов, в последнее время также включают незрелые дендритные клетки. В процессе фагоцитоза макрофагами из организма также удаляются стареющие и погибшие клетки [13].

Независимо от типа фагоцитирующих клеток процесс фагоцитоза обязательно сопровождается респираторным взрывом. Под ре-

спираторным взрывом (дыхательный взрыв, respiratory burst) в фагоцитирующих клетках понимается процесс повышения синтеза активных форм кислорода (АФК), который развивается в клетках при фагоцитозе и регуляторных воздействиях. При этом клетки начинают активно потреблять кислород. В понятие АФК, на сегодняшний день, включают широкий спектр реакционно-активных форм соединений кислорода (радикалы, анионы), связанных с первичным синтезом супероксид-радикала. Все АФК делятся на две основные группы первичные АФК и вторичные. К первичным АФК относятся такие молекулы, как супероксид-радикал ($O_2^{\bullet-}$) и монооксид азота (NO). Последний, как отмечено в работе Ю.А. Владимирова и Е.В. Проскурниной (2009), также может определяться как активная форма азота [2].

Первичные АФК, обладающие регуляторным и умеренным бактерицидным действием, синтезируются в клетках в процессе ферментативной реакции: супероксид-радикал в ферментативной системе НАДФН-оксидазы, монооксид азота — NO-оксидазой.

Образование первичных АФК активирует комплекс ферментов, которые синтезируют вторичные АФК. К ним, в частности, относятся перекись водорода (H_2O_2), синтезируемая супероксиддисмутазой из супероксид-радикала, хлорноватистая кислота (HOCl), синтезируемая миелопероксидазой из H_2O_2 [17]. Некоторые вторичные АФК образуются в процессе неферментативных реакций. Так, супероксид-радикал может вступать в реакцию с NO с образованием пероксинитрита ($OONO^-$), который способен окислять NH- и SH-группы белков [2]. Все вторичные АФК обладают выраженной бактерицидной активностью.

Синтез АФК связан не только с механизмами респираторного взрыва, но и с процессами окислительного стресса. Под окислительным стрессом (оксидативный стресс, oxidative stress) понимаются процессы повреждения клеток и биологических молекул в результате окисления, которое развивается при повышении количества прооксидантов и уменьшении содержания антиоксидантов [2]. Кроме того, АФК могут синтезироваться в клетках и вне клеток за счет различных физиологических и патофизиологических процессов. Доказано, что 95% всего потребляемого клеткой кислорода попадает в митохондрии и участвует в реакциях окислительного фосфорилирования [17]. К другим важным физиологическим процессам с участием АФК относятся: стимуляция митоза и апоптоза, участие в межклеточных коммуникациях, высвобождение свободной арахидоновой кислоты из мембраны с последующим синтезом иммуноактивных соединений и т. д.

[32]. Широко известным патофизиологическим процессом с участием АФК является перекисное окисление липидов, которое активируется при развитии широкого спектра заболеваний [2]. В ряде случаев АФК кислорода могут индуцировать канцерогенез [20].

Синтез АФК в процессе респираторного взрыва фагоцитирующих клеток

Способность к продукции активных форм кислорода является одним из универсальных свойств фагоцитов позвоночных и беспозвоночных животных. В ответ на антигенный стимул или регуляторный сигнал повышается интенсивность потребления кислорода фагоцитирующими клетками. Кислород необходим не только для процессов жизнедеятельности самих клеток (например, аэробное дыхание), но и является основой для синтеза АФК, необходимых для уничтожения фагоцитированных объектов [2, 17].

Ключевым событием образования АФК является сборка ферментативного комплекса НАДФН-оксидазы (NADPH-oxidase, NOX) [17]. Фермент представляет собой клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный комплекс, локализующийся преимущественно на цитоплазматической мембране и в некоторых органеллах. В организме человека и млекопитающих выделяют 7 типов NOX, различающихся по составу субъединиц, клеточной специфичности, регуляции и некоторым другим параметрам (NOX1–5, LNOX1 и LNOX2) [42]. Например, NOX1 локализуется в различных типах клеток (эндотелий, клетки гладкой мускулатуры, эпителий кишечника, остеокласты, нейроны, глиальные клетки и фибробласты), участвует в регуляции кровяного давления, в росте и миграции гладкомышечных клеток. NOX2 преимущественно экспрессируется в моноцитарных и миелоцитарных клетках, инициирует развитие респираторного взрыва. Основой НАДФН-оксидазы являются две мембранные единицы: p91phox и p22phox. Субъединица p91phox содержит участок связывания НАДФН и протетическую группу FAD в C-концевой (цитоплазматической) части. «Phox» в составе белков характеризует фагоцитарную роль фермента (phagocyte oxidase). В процессе активации НАДФН-оксидазы к мембранным субъединицам присоединяются цитоплазматические субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox) и малый G-белок Rac1. Процесс сборки начинается с белка p47phox, который предварительно должен быть фосфорилирован протеинкиназой С. Необходимым условием этого являются сигнала-

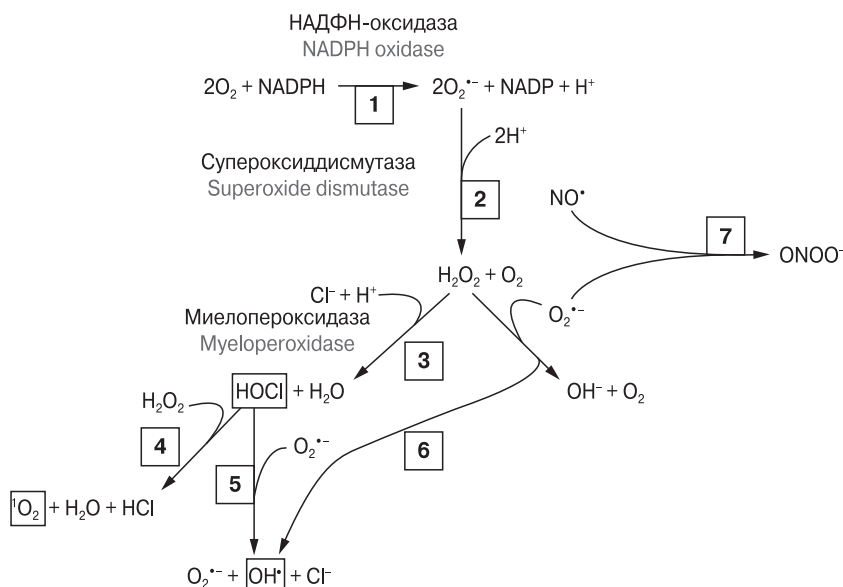


Рисунок 1. Механизм синтеза АФК фагоцитирующими клетками (по Beutler)

Figure 1. Mechanism of the ROS synthesis by phagocytic cells (according to Beutler)

Примечание: цифрами в рамках на рисунке обозначен номер реакции (пояснения в тексте).

Note: the numbers in the frame indicate the reaction number (explanation in the text).

лы от рецепторов фагоцитирующих клеток, отвечающих за распознавание патогена. Сборка ферментативного комплекса приводит к тому, что один из его компонентов, а именно gp91phox, приобретает конформацию, способную передавать электрон, полученный от цитоплазматического НАДФН, на молекулу кислорода O_2 (реакция 1 на рис. 1). В результате этой реакции образуется короткоживущий супероксид-радикал или супероксид-анион ($\text{O}_2^{\bullet-}$), сочетающий в себе свойства аниона и радикала. Сам по себе он относится к АФК с низкой бактерицидной активностью, но способен запускать последующую цепь реакций, приводящих к формированию токсичных для микроорганизмов активных форм кислорода. Также необходимо отметить, что НАДФН синтезируется в пентозофосфатном цикле, что определяет зависимость активности НАДФН-оксидазы от внутриклеточных метаболических процессов.

В ходе следующей реакции супероксид-радикал (реакция 2 на рис. 1) взаимодействует с протонами, в результате чего образуется перекись водорода (H_2O_2), обладающая выраженной антимикробной активностью. Эта реакция протекает в присутствии фермента супероксиддисмутаза (СОД). Перекись водорода способна вызывать окисление SH-групп у различных белков и вызвать перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот. В организме человека и млекопитающих существует три типа СОД, различающихся по локализации, массе и виду переходного металла-кофактора в активном центре [18]. СОД1 локализуется в цитоплазма-

тическом компартменте, СОД2 — в митохондриях, СОД3 является внеклеточной формой. Атом Zn является структурным компонентом, тогда как атом Cu входит в состав активного центра СОД1 и СОД3. В составе активного центра СОД2 находится атом Mn. В составе активного центра СОД, выделяемых из бактерий, также обнаруживается атом Fe.

Образование перекиси водорода запускает каскад процессов, приводящих к формированию еще более токсичных форм кислорода. Так, в присутствии миелопероксидазы начинается формирование галогидных производных (реакция 3 на рис. 1). При наличии протонов и ионов хлора реакция протекает с образованием хлорноватистой (гипохлорной) кислоты (НОСl), обладающей высоким антимикробным эффектом. При взаимодействии хлорноватистой кислоты с аминокислотами происходит образование хлораминов, которые также обладают микробицидным действием.

НОСl может окисляться перекисью водорода (реакция 4 на рис. 1) с образованием синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), основной мишенью которого являются полиненасыщенные жирные кислоты. Результатом перекисного окисления последних является деструкция поверхностной мембраны микроорганизмов. С другой стороны, при взаимодействии с белками $^1\text{O}_2$ способен разрушать ковалентные связи между молекулами углерода. НОСl может взаимодействовать с $\text{O}_2^{\bullet-}$ (реакция 5 на рис. 1), в результате чего образуется гидроксильный радикал (HO^\bullet). Этот же радикал образуется и в ходе еще одной

реакции — спонтанной дисмутации (реакция 6 на рис. 1), которая протекает в присутствии ионов железа. В результате этой реакции происходит взаимодействие супероксид-радикала с перекисью водорода (реакция Фентона) [2]. Образовавшийся гидроксильный радикал считается одним из самых токсичных метаболитов кислорода. Под его действием происходит разрыв нитей ДНК и пептидных связей внутри белковых молекул, окисление сульфгидрильных групп и т. д.

Супероксид-радикал принимает участие еще в нескольких реакциях, например (реакция 7, рис. 1), в формировании пероксинитрита (OONO^-), окисляющего сульфгидрильные группы различных молекул. Кроме этого при взаимодействии супероксидрадикала с водой идет формирование озона (O_3), также обладающего широким антимикробным действием.

Методы оценки синтеза АФК с помощью проточной цитометрии

Проточная цитофлуориметрия — современная технология быстрого измерения характеристик клеток при помощи моноклональных антител или других зондов, позволяющая судить об их типе (по наличию того или иного набора клеточных маркеров) и функциональном состоянии (по изменению протекающих в них процессах). Принципиальным преимуществом проточной цитометрии по сравнению с другими общепринятыми и доступными лабораторными методами клеточного анализа является анализ индивидуальных параметров каждой клетки проанализированного образца. Анализ осуществляется в проточной ячейке прибора, где при помощи «гидродинамического фокусирования» частицы выстраиваются таким образом, чтобы проходить через зону анализа по очереди — одна за другой. Кроме того, современные приборы могут регистрировать несколько параметров для каждой отдельной клетки со скоростью до 10^5 клеток в секунду, тогда как анализ большого количества клеток (до 10^7 клеток и более в одном образце) позволяет достигать высокой статистической достоверности получаемых результатов. Применение логических ограничений (введение в протокол исследования различных зон анализа для клеток или «гейтов» одновременно) допускает определение нескольких субпопуляций клеток в одном образце. Это особенно важно при характеристике гетерогенных клеточных популяций — например, лейкоциты периферической крови, среди которых можно выявить отдельно нейтрофилы и моноциты для оценки уровня продукции АФК каждой клеточной популяции (рис. 2).

Как уже отмечалось, процесс поглощения объекта фагоцитоза клеткой сопровождается образованием в фаголизосоме широкого спектра АФК, обладающих бактерицидным действием. Для исследования различных продуктов этих реакций широко применяются методы проточной цитофлуориметрии. В настоящее время использование специфических флуоресцентных красителей позволило изучить продукцию практически всех кислородных радикалов у фагоцитов. В таблице приведены некоторые из этих красителей. Несмотря на широкий спектр известных красителей, наиболее часто в иммунологических исследованиях применяются только три, а именно — дигидроэтидин, дихлородигидрофлуоресцеин и дигидрородамин 123. Все эти красители способны спонтанно диффундировать сквозь мембрану клеток и накапливаться в цитоплазме. Для эффективного возбуждения этих красителей применяются источники света с длиной волны около 488 нм, то есть самые распространенные и доступные большинству диагностических лабораторий. Для регистрации флуоресценции в случае дигидроэтидина используется фильтр с длиной волны пропускания около 610 нм (канал проточного цитометра, где идет регистрации фикоэритрина), тогда как в случае дихлородигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 регистрация сигнала осуществляется в диапазоне 510–520 нм, что соответствует каналу для регистрации ФИТЦ.

Гидроэтидин (дигидроэтидин). Дигидроэтидин применяется для исследования продукции супероксид-радикала. После спонтанного проникновения через мембрану фагоцитирующей клетки, обусловленного наличием липофильных свойств, дигидроэтидин взаимодействует с $\text{O}_2^{\bullet-}$ с образованием двух флуоресцирующих форм — этидиума (E^+) и 2-гидроксиэтидиума (2-OH-E^+). При этом показано, что формирование E^+ вызвано неспецифическими окислительно-восстановительными реакциями, которые не имеют прямого отношения к образованию супероксид-радикала [50]. В то же время 2-гидроксиэтидиум, спектральные характеристики которого весьма близки к таковым E^+ , накапливается в клетках только в присутствии супероксид-радикала. Оба образовавшихся в ходе окисления вещества способны при облучении источником света с длиной волны около 500 нм испускать флуоресценции в красной части спектра с максимумом в районе 610 нм. Однако интенсивность их флуоресценции значительно возрастает после накопления в митохондриях или после перемещения в ядро клетки, где они связываются с ДНК [16]. Особо следует подчеркнуть тот факт, что другие активные формы кислорода — например, ONOO^- , OH^\bullet и H_2O_2 —

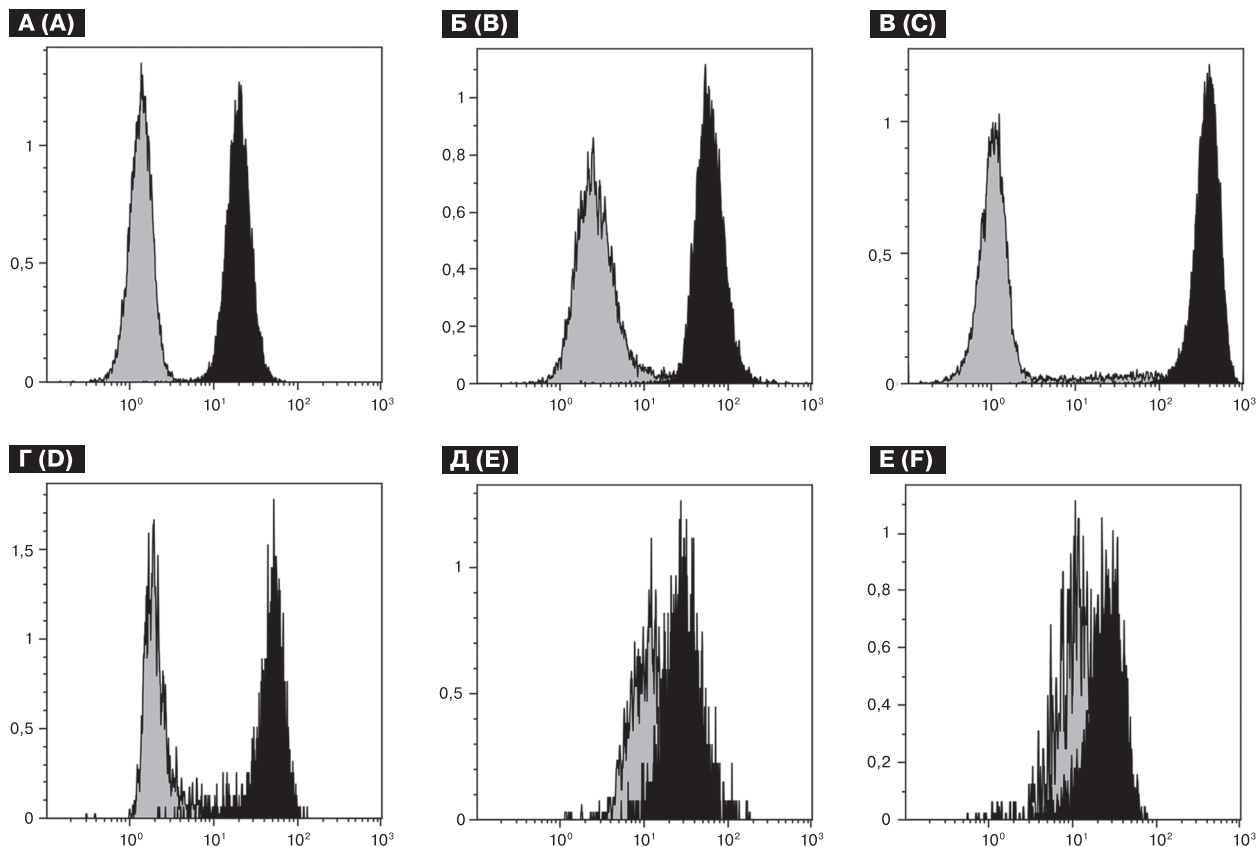


Рисунок 2. Продукция активных форм кислорода нейтрофилами (гистограмма А–В) и моноцитами (Г–Е) периферической крови

Figure 2. Reactive oxygen species production by peripheral blood neutrophils (histogram A–C) and monocytes (D–F)

По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции дигидроэтидина (А и Г), 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина (Б и Д) и дигидрородамина 123 (В и Е) соответственно; по оси ординат — количество проанализированных клеток.

Серым цветом представлена спонтанная продукция АФК, черным — продукция АФК после 15 мин инкубации клеток периферической крови в присутствии 50 нг/мл форболового эфира. Нейтрофилы выделены на основании экспрессии CD16, моноциты — на основании экспрессии CD14.

X-axis — the fluorescence intensity of dihydroethidine (A and G), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (B and D) and dihydrorhodamine 123 (B and E), respectively; the y-axis — the number of cells. Gray — spontaneous ROS production, black — peripheral blood cells were incubated in the presence of 50 ng/ml of for 15 min PMA. Neutrophils were isolated based on CD16 expression, while monocytes were isolated based on CD14 expression.

Таблица. Флуоресцентные красители, применяемые для исследования продукции активных форм кислорода при помощи проточной цитофлуориметрии

Table. Fluorescent dyes widely used by flow cytometry to study the reactive oxygen species production

Краситель Fluorescent dye	Ex/Em, нм Ex/Em, nm	Лиганд Ligand
Гидроэтидин (дигидроэтидин)/Hydroethidine (dihydroethidine)	520/610	$O_2^{\bullet-}$
H ₂ DCFH, 2',7'-дигидродихлорфлуоресцеина диацетат/ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	498/522	H ₂ O ₂ , OH [•] , ROO [•]
Amplex Red	360/460	H ₂ O ₂
DHR, дигидрородамин 123/dihydrorhodamine 123	505/529	H ₂ O ₂ , HOCl, ONOO ⁻
DMA, 9,10-диметилантрацен/9,10-dimethylantracene	375/436	1O_2
CHD, 1,3-циклогександион/1,3-cyclohexanedione	400/452	OH [•]
APF, аминофенилфлуоресцеин/aminophenyl fluorescein	500/520	HOCl, HO [•]
DPBF, 1,3-дифенилизобензофурат/1,3-diphenylisobenzofuran	410/455	$O_2^{\bullet-}$, 1O_2
β-фикоэритрин/β-phycoerythrin	520/580	ROO [•]

способны окислять дигидроэтидин именно до E^+ , что не позволяет рассматривать данный краситель в качестве специфического для определения уровня продукции $O_2^{\bullet-}$ фагоцитирующими клетками. Вместе с тем использование дигидроэтидина позволяет судить о способности клеток к формированию активных форм кислорода в целом, что не снижает его клинической значимости при диагностике и прогнозе характера течения широкого спектра заболеваний, связанных с нарушениями фагоцитарного звена врожденного иммунитета [33]. На модели экспериментальных животных на основе реакции дигидроэтидина разработан протокол определения активности миелопероксидазы *in vivo* и *ex vivo* в артериях для оценки воспалительных процессов и заболеваний сосудов [43].

Ограничения, связанные с неспецифическим формированием флуоресцирующих форм дигидроэтидина, распространяются и на его два основных аналога — гидропропидин и MitoSOX™ Red. Гидропропидин является водорастворимым аналогом дигидроэтидина, лишенным липофильных свойств, благодаря наличию сильного положительного заряда у молекулы [31]. Данная особенность строения молекулы предотвращает ее поглощение клетками, что позволяет использовать этот флуоресцентный зонд для измерения внеклеточного супероксид-радикала при помощи флуориметрии, а не проточной цитометрии. Краситель MitoSOX™ Red применяется для оценки уровня супероксид-радикала в митохондриях клеток при помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии [38].

Альтернативой дигидроэтидина могут служить высокоспецифические красители, флуоресценция которых не зависит от окислительно-восстановительных реакций. Например, соединения типа бис-(2,4-динитробензолсульфонил) флуоресцеинов [34].

H_2DCFH (2,7-дихлородигидрофлуоресцеин). 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин получил широкое распространение в иммунологических и цитологических исследованиях благодаря тому, что в форме диацетата (DCFH-DA) он способен спонтанно проникать через мембрану клеток [15]. После прохождения мембраны под действием неспецифических эстераз, локализованных в цитоплазме клеток, он превращается в нефлуоресцирующее соединение — дихлородигидрофлуоресцеин (DCFH). В присутствии пероксидазы происходит окисление DCFH за счет H_2O_2 , после чего DCFH переходит в форму дихлорофлуоресцеина (DCF), обладающего выраженной флуоресценцией в зеленой части спектра. Именно эта форма красителя и регистрируется в клетках при проведении анализа с помощью методов проточ-

ной цитофлуориметрии. Например, Wang Y. et al. (2017) на основе анализа с DCFH-DA охарактеризовали состояние респираторного взрыва макрофагов при формировании атеросклеротической бляшки [47].

Несмотря на широкое применение данного красителя в иммунологических исследованиях и в клеточной биологии в целом, DCFH-DA не может служить надежным индикатором для определения внутриклеточной H_2O_2 и других АФК по целому ряду причин. Во-первых, этот краситель непосредственно с H_2O_2 не реагирует с формированием флуоресцентного соединения, используемого для регистрации флуоресценции при помощи цитометрии. Во-вторых, помимо перекиси водорода в цитоплазме клеток окисление DCFH может происходить и под действием гидроксильных (HO^{\bullet}), пероксильных (ROO^{\bullet}) радикалов и некоторых других. Также существенным ограничением является и тот факт, что промежуточная форма красителя DCFH — $DCF^{\bullet-}$ — способна самостоятельно реагировать с кислородом с образованием супероксид-радикала, который, в свою очередь, в ходе дисмутации формирует внутриклеточную перекись водорода. Последнее событие приводит в более эффективному окислению DCFH во флуоресцирующую форму и сопровождается «искусственной» амплификацией флуоресцентного сигнала, регистрируемого при анализе клеток [24]. И, наконец, редокс-активные ионы металлов (например, Fe^{2+}), входящие в состав активных центров широкого спектра внутриклеточных ферментов, способны катализировать окисление DCFH, что тоже выражается в усилении флуоресценции клеток. Эти обстоятельства накладывают существенные ограничения на применение DCFH-DA как высокоспецифического флуоресцентного красителя для оценки уровня продукции АФК клетками, однако не снижают его популярности как показателя для оценки различных окислительно-восстановительных процессов, протекающих в живых системах [30, 48].

Дигидрорадамин 123 (DHR123). Как и дихлородигидрофлуоресцеин, дигидрорадамин 123, обладающий липофильными свойствами, способен спонтанно диффундировать через большинство клеточных мембран в виде нефлуоресцирующего соединения. Уже в цитоплазме под действием окислителя, в качестве которого выступает перекись водорода (а также в присутствии пероксидазы, цитохрома С или двухвалентного железа), краситель превращается в родамин 123, флуоресцирующий в зеленой части спектра с максимумом около 529 нм. Так как родамин 123 обладает катионными свойствами, то обычно он накапливается в составе митохондрий.

Окисление дигидрородамина может происходить под действием HOCl и пероксинитрита ONOO^- , формирующегося в ходе реакции оксида азота и супероксид-радикала, образовавшихся в результате быстрого и спонтанного распада пероксинитрита. Таким образом, данный краситель окисляется ONOO^- опосредованно и не может рассматриваться в качестве специфического маркера для его регистрации в клетках. Более того, промежуточный радикал дигидрородамин — DHR^{\bullet} — способен реагировать с молекулами кислорода, что сопровождается искусственной амплификацией флуоресценции клеток за счет действия молекул красителя, накопившихся в клетке [49]. Несмотря на столь низкую специфичность в выявление конкретных АФК в клетках, дигидрородамин широко применяется в иммунологических исследованиях. Более того, именно этот флуоресцентный краситель является «золотым стандартом» в диагностике такого первичного иммунодефицитного состояния как хроническая гранулематозная болезнь [45].

В работе Navixbeck J.J. et al. (2015) продемонстрирован многопараметрический подход, основанный на платформе для визуализации проточной цитометрии для изучения антимикробных реакций фагоцитов против грамотрицательных бактерий *Aeromonas veronii* [27]. Известно, что этот возбудитель вызывает выраженные воспалительные реакции у различных видов животных, включая людей. Установлено, что интенсивность фагоцитоза *A. veronii* в исследуемом промежутке времени находилась в прямой зависимости от активности респираторного взрыва. Вместе с тем с помощью проточной цитометрии выделены фракции макрофагов, в которых связывание и фагоцитоз *A. veronii* не коррелировал с уровнем синтеза АФК. Авторы отмечают, что представленный ими многопараметрический подход, основанный на проточной цитометрии на основе анализа изображений, позволяет провести сегрегацию уникальных популяций фагоцитов и изучить их последующие антимикробные реакции.

Хемилюминесцентный анализ респираторного взрыва фагоцитирующих клеток

Другим методом оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток является хемилюминесцентный анализ. Под люминесценцией понимается широкий ряд реакций, в которых возбужденные молекулы переходят в основное состояние с испусканием кванта света [2, 10]. Люминесценция химических реакций называется хемилюминесценцией.

Хемилюминесценция довольно часто возникает в реакциях окисления или при рекомбинации радикалов. Для ее возникновения прежде всего необходимо, чтобы общая выделяемая энергия была больше 70 ккал/моль (это соответствует диапазону энергий видимой области спектра 400–700 нм). В этих условиях может образоваться электронно-возбужденный продукт, возвращение которого в основное состояние сопровождается излучением видимого света. Свечение это довольно слабое, поскольку квантовый выход электронно-возбужденного продукта невысок (0,001–0,1). При этом под квантовым выходом хемилюминесценции понимается число испущенных квантов на один акт реакции [2].

Выделяют 3 главных этапа хемилюминесцентной реакции [2, 10, 14]. Первым является подготовительный этап, в рамках которого осуществляется превращение исходных реагентов. С точки зрения механизма респираторного взрыва на этом этапе осуществляется синтез АФК. Второй этап определяется как ключевой, в рамках которого образуются продукты химической реакции (то есть взаимодействие ионов и радикалов) — часть из них находится электронно-возбужденном состоянии. И на третьем этапе осуществляется испускание кванта света, а также различные процессы безызлучательной дезактивации эмиттера хемилюминесценции и, соответственно, переход электронно-возбужденной молекулы в «спокойное» состояние. Данный этап характеризуется такими показателями, как время жизни эмиттера и квантовый выход люминесценции. В связи с тем, что образовавшиеся на ключевой стадии электронно-возбужденная молекула эмиттера не всегда дезактивируется испусканием кванта света, квантовый выход люминесценции многих возбужденных продуктов бывает низким. Для усиления интенсивности хемилюминесцентной реакции используют метод сенсibilизации излучения. Для этого в хемилюминесцентную пробу добавляют специальный акцептор излучения (индикатор, активатор, вторичный эмиттер), на который осуществляется безызлучательный перенос энергии электронно-возбужденной молекулы с последующим испусканием кванта света. Квантовый выход подобных хемилюминесцентных реакций значительно увеличивается. В зависимости от присутствия в реакционной смеси индикаторов или их отсутствия хемилюминесцентная реакция определяется, соответственно, как активированная (зависимая от индикатора) или неактивированная [14]. Обязательным требованием к подобным индикаторам хемилюминесцентной реакции является отсутствие какого-либо воздействия на биологические объекты.

В качестве основных индикаторов, которые на сегодняшний день используются в хемилюминесцентном анализе оценки состояния респираторного взрыва выступают люминол и люцигенин [2, 10]. Люминол ($C_8H_7N_3O_2$) представляет собой белые или светло-желтые кристаллы, хорошо растворимые в полярных органических растворителях и практически не растворимые в воде. Люминол взаимодействует со всеми формами АФК. Это, безусловно, определяет невозможность его использования для оценки уровня синтеза конкретной АФК, но, с другой стороны, позволяет интегрально охарактеризовать состояние респираторного взрыва фагоцитирующих клеток.

Кроме люминола, в качестве хемилюминесцентного индикатора также широко используется люцигенин (N,N-диметилбиакридилнитрат). Представляет собой золотисто-желтые кристаллы хорошо растворимые в воде. Наиболее чувствителен к супероксид-радикалу. В связи с этим, люцигенин-зависимая хемилюминесценция преимущественно используется для оценки уровня синтеза данной первичной АФК [2, 10].

Также для оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток используются и другие хемилюминесцентные индикаторы. Так, аналогом люминола является индикатор L-012 (8-амино-5-хлор-7-фенилпиридо[3,4-d]пиридазин-1,4-(2H,3H)дион). Считается, что интенсивность хемилюминесценции при использовании L-012 в 100 раз выше, чем в люминол-зависимой хемилюминесценции [2, 51]. Кроме того, разработаны молекулы еще более усиливающие хемилюминесцентную активность L-012. Так, в работе Ichibangase T. et al. (2014) сообщается, что чувствительность определения H_2O_2 в хемилюминесцентной реакции L-012 в комплексе с 2-(4-гидроксибензил)-4,5-ди(2-пиридил)имидазолом и 4-йодфенолом составила 0,29 и 1,5 пмоль соответственно [29].

Разработан хемилюминесцентный индикатор 2-метил-6-[p-метоксифенил]-3,7-дигидроимидазо[1,2-a]пиразин-3-он (MCLA), который является чувствительным к синглетному кислороду и супероксид-радикалу [46]. В работе Hosaka S. et al. (2005) продемонстрирован метод оценки эффективности антиоксидантов по их снижению интенсивности MCLA-зависимой хемилюминесценции [28].

Таким образом, в запасе исследователей респираторного взрыва фагоцитирующих клеток имеется широкий спектр хемилюминесцентных индикаторов, позволяющих с высокой степенью чувствительности оценивать как интегральное состояние респираторного взрыва (весь синтезируемый клетками комплекс АФК), так и отдельные АФК.

Кинетика хемилюминесцентной реакции при оценке респираторного взрыва нейтрофилов крови у здоровых людей на примере люминола представлена на рисунке 3, где отображены спонтанная хемилюминесценция (1) и зимозан-индуцированная (2) нейтрофильных гранулоцитов. Наличие четко выраженной кинетики спонтанной хемилюминесценции связано с действием комплекса различных регуляторных факторов на клетки (например, изменение состава среды, температуры и т. д.). Опсонизированный зимозан является наиболее распространенным индуктором дыхательного взрыва фагоцитирующих клеток [10]. Зимозан представляет собой полисахарид, содержащийся в стенках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме индукции респираторного взрыва фагоцитов, зимозан также способен активировать комплемент в присутствии пропердина по альтернативному пути. Опсонизированный зимозан индуцирует более интенсивный респираторный взрыв фагоцитирующих клеток, чем исходный.

Характеристику состояния респираторного взрыва осуществляют по следующим показателям, регистрируемым отдельно для спонтанной и индуцированной хемилюминесценции: время выхода на максимум (3), максимум интенсивности хемилюминесценции (4), площадь под кривой хемилюминесценции и индекс актива-

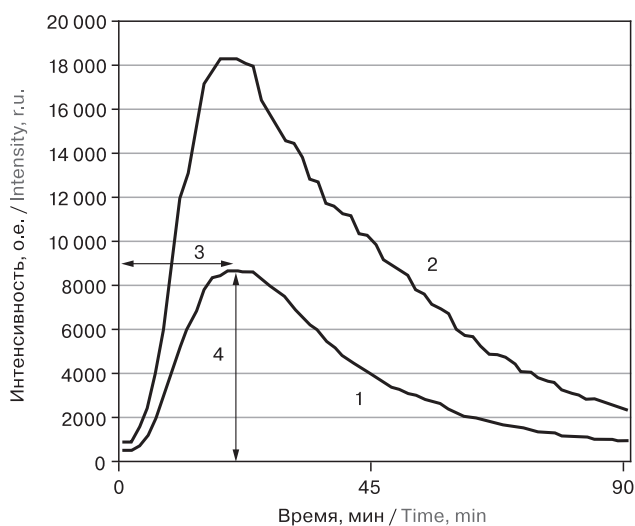


Рисунок 3. Кинетика спонтанной (1) и зимозан-индуцированной (2) хемилюминесценции нейтрофилов крови здоровых людей

Figure 3. Kinetics of spontaneous (1) and zymosan-induced (2) chemiluminescence of blood neutrophils in healthy people

Примечание: цифрами на рисунке обозначены: 3 — время выхода на максимум хемилюминесценции; 4 — максимум хемилюминесценции.

Note: the digits in figure is indicated: 3 — time to peak chemiluminescence; 4 — maximum of chemiluminescence.

ции. Время выхода на максимум характеризует длительность развития максимальной активности синтеза АФК от момента антигенной или регуляторной индукции респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Этот период, прежде всего, зависит от состояния внешней цитоплазматической мембраны и метаболизма клеток [10]. При острых инфекционно-воспалительных заболеваниях, когда нейтрофилы находятся в активированном состоянии, время выхода на максимум хемилюминесценции сокращается [11]. В то же время при хронических воспалительных процессах, на фоне снижения активности основных метаболических процессов в фагоцитах, время выхода на максимум хемилюминесцентной активности увеличивается. Максимум интенсивности хемилюминесценции определяет максимальную активность синтеза АФК клеткой. Площадь под кривой хемилюминесценции интегрально характеризует весь комплекс АФК, вырабатываемых фагоцитами за исследуемый период. Максимум интенсивности и площадь под кривой также зависят от функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. Индекс активации вычисляется через отношение площади под кривой индуцированной хемилюминесценции к площади под кривой спонтанной хемилюминесценции и характеризует наличие внутриклеточных метаболических резервов для реализации респираторного взрыва.

В целом, можно заключить, что хемилюминесцентный анализ является высокочувствительным и дает возможность получения бесконтактной информации о состоянии респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Кроме того, на основе хемилюминесцентного анализа также имеется возможность оценки влияния различных регуляторных факторов и патогенов на функцию фагоцитов.

Роль респираторного взрыва фагоцитирующих клеток при различных иммунопатогенетических состояниях

Изменение состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток выявляется при многих иммунопатологических состояниях. Наиболее выраженные изменения в синтезе АФК фагоцитами обнаружены при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Так, О.В. Бердюгина и А.В. Ершова (2016) с помощью методов проточной цитометрии установили, что при фиброзно-кавернозной форме туберкулеза у больных в периферической крови снижается процент моноцитов способных к синтезу супероксид-радикала [1]. Причем снижение количества данной фракции моно-

цитов осуществлялось синхронно понижению поглотительной способности клеток. В работе Scharn C.R. et al. (2016) показано, что макрофаги легких слабее синтезировали первичные АФК (супероксид-радикал и монооксид азота) при туберкулезе [40]. Saengmuang P. et al. (2014) обнаружили снижение интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов и фагоцитоза при инфицировании клеток внутриклеточной патогенной бактерией *Burkholderia pseudomallei* [39]. Наиболее выраженные нарушения функциональной активности фагоцитов выявлены у пожилых людей и лиц с нарушенным гликемическим обменом.

Вирусные инфекции также влияют на состояние респираторного взрыва фагоцитов. Установлено, что воздействие на трансмембранный рецептор вируса герпеса (HVEM), который экспрессируется на нейтрофильных гранулоцитах, вызывает активацию эффекторных функций клеток данной популяции, включая респираторный взрыв, дегрануляцию, секрецию IL-8 и фагоцитоз [26]. Такой эффект определяется тем, что HVEM входит в состав семейства рецепторов фактора некроза опухоли. Развитие респираторного взрыва нейтрофилов крови в ответ на вирусную инфекцию зависит от их степени зрелости и фенотипа. В работе Pliyev B.K. et al. (2012) показано, что на фоне гриппозной инфекции в крови повышалось количество нейтрофилов с фенотипом CD35-CD49d⁺, которые были охарактеризованы как клетки с уменьшенной зернистостью и признаками метамиелоцитов [36]. При этом у CD35-CD49d⁺-нейтрофилов также выявлялся более низкий уровень респираторного взрыва и фагоцитоза. Tripathi S. et al. (2015) представлено исследование стимулирующей активности кателицидина LL-37 (cathelicidin LL-37, лизосомальный белок макрофагов и нейтрофилов) на состояние респираторного взрыва нейтрофилов на фоне инфекции вирусом гриппа [44]. Установлено, что кателицидин LL-37 стимулирует респираторный взрыв полиморфноядерных гранулоцитов посредством взаимодействия через формилпептидный рецептор 2 (FPR-2).

Как отмечалось выше, хемилюминесцентный анализ позволяет оценивать и регуляторные особенности респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Так, на основе хемилюминесцентного анализа респираторного взрыва нейтрофилов крови разработан метод оценки клеточной чувствительности к IFN α 2 [5]. В работе Л.М. Куртасовой с соавт. (2016) показано, что у детей с инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, в острый период заболевания отмечается уменьшение диапазона клеточной чувствительности лейкоцитов крови к IFN α 2 и наблюдается зависимость клеточной чув-

ствительности от дозы препарата и тяжести заболевания [4]. Полученные данные, по мнению авторов, свидетельствуют о необходимости индивидуального подхода к интерферонотерапии у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр.

Выраженные изменения синтеза АФК фагоцитирующими клетками обнаружены при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Обнаружено, что у больных распространенным гнойным перитонитом состояние респираторного взрыва нейтрофилов характеризуется повышением уровня синтеза как первичных, так и вторичных АФК [11]. Повышается скорость активации НАДФН-оксидазы, что, однако, может привести к быстрому метаболическому истощению нейтрофилов. Установлена информативность показателей респираторного взрыва нейтрофилов в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) [6]. У больных РГП, у которых в динамике послеоперационного периода развивается абдоминальный сепсис, хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови характеризуется пониженным уровнем спонтанного синтеза первичных АФК и повышенным уровнем спонтанного синтеза вторичных АФК. Уровни синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами при индукции респираторного взрыва опсонизированным зимозаном незначительно различаются в группах больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса в послеоперационном периоде [7]. Авторами выявлена зависимость хемилюминесцентных показателей нейтрофилов от содержания TNF α и IL-6 в крови.

В работе Sikora J.P. et al. (2008) представлены результаты исследования особенностей синтеза АФК нейтрофилами у детей с ожоговой болезнью на фоне развития системного воспалительного ответа [41]. Продемонстрирована зависимость состояния респираторного взрыва нейтрофилов от концентрации некоторых цитокинов в крови. Установлено, что при развитии системного воспалительного ответа у детей с ожоговой болезнью интенсивность кислородного метаболизма фагоцитирующих клеток снижается. Авторы отмечают наличие клинической значимости показателей цитометрического анализа на основе BURSTTEST в прогнозе характера течения системного воспалительного ответа.

В работе О.В. Смирновой с соавт. (2016) показано, что у больных механической желтухой (МЖ), вызванной желчекаменной болезнью, интенсивность спонтанной и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов была снижена по сравнению с контрольными значениями [12]. При МЖ

злокачественного генеза обнаружено повышение интенсивности зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. Также при МЖ обнаружена зависимость между интенсивностью хемилюминесценции нейтрофилов и уровнем билирубина в крови.

В настоящее время интенсивно исследуется роль различных типов фагоцитирующих клеток в онкогенезе. Большой интерес вызывают исследования функции нейтрофилов и моноцитов крови, что связано с их ролью в регуляции иммунных реакций и в реализации воспалительных процессов при опухолевом росте [3, 9]. Актуальность изучения физиологии и функции дендритных клеток определяется необходимостью расшифровки фундаментальных механизмов инициации адаптивного иммунитета и практической значимостью при разработке клеточных технологий иммунотерапии [19]. Ряд исследований посвящено неоднозначной роли макрофагов в опухоли [22, 37]. Не меньший интерес вызывают исследования роли нейтрофилов в онкогенезе. Это связано, с тем, что нейтрофилы, являясь высокорепликативными клетками, реагируют практически на любые изменения внутренней среды организма, в том числе и на опухолевый рост [8, 13]. Доказано цитотоксическое действие нейтрофильных гранулоцитов на раковые клетки. Кроме того, обнаружено, что если на ранних стадиях развития опухоли нейтрофилы реализуют противоопухолевую стратегию, то на поздних стадиях онкогенеза выявляется проопухолевая активность нейтрофилов [25].

С помощью хемилюминесцентного анализа обнаружено, что у больных раком почки наблюдается повышенный уровень респираторного взрыва нейтрофилов крови, который определяется синтезом как первичных, так и вторичных АФК [8]. При этом обнаружены взаимосвязи между уровнем синтеза АФК и фенотипическим составом нейтрофилов. Так, если у здоровых людей интенсивность респираторного взрыва была положительно взаимосвязана с количеством CD11b⁺-, CD62L⁺- и CD64⁺-нейтрофилов, то при онкологическом заболевании данные корреляции были потеряны.

В работе Л.М. Куртасовой с соавт. (2016) установлены особенности изменения состояния респираторного взрыва нейтрофилов у больных раком почки и мочевого пузыря в динамике заболевания [3]. Обнаруженные изменения зависят от локализации опухолевого процесса. У больных раком почки изменения преимущественно затрагивают продукцию первичных АФК, у больных раком мочевого пузыря — начальные стадии окислительного метаболизма и вторичные АФК. Обнаружено, что восстановление компенсаторных метаболи-

ческих возможностей нейтрофилов крови в послеоперационном периоде быстрее происходит у больных раком мочевого пузыря. При исследовании активности респираторного взрыва и фенотипа моноцитов крови у больных раком почки обнаружено, что интенсивность синтеза АФК снижена [9]. При этом установлены особенности в распределении интенсивности респираторного взрыва по субпопуляциям моноцитов: снижается активность респираторного взрыва в моноцитах с фенотипом CD14⁺CD16⁻, но повышается в моноцитах с фенотипом CD14⁺CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺.

Таким образом, оценка респираторного взрыва фагоцитирующих клеток позволяет охарактеризовать фундаментальные механизмы реагирования клеток врожденного иммунитета на патогенные и регуляторные воздействия, а также разрабатывать новые высокочувствительные методы диагностики и прогноза развития и исхода различных иммунопатологических состояний. Представленные методы проточной цитометрии и хемилюминесцентного анализа позволяют определять как интегральное состояние респираторного взрыва, так и уровни и кинетические параметры синтеза отдельных АФК.

Список литературы/References

1. Бердюгина О.В., Ершова А.В. Функционально-метаболические особенности фагоцитов крови при разных формах туберкулезного воспалительного процесса легких // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 21–32. [Berdyugina O.V., Ershova A.V. Functional-metabolic features of blood phagocytes in different forms of tuberculous inflammatory process of the lungs. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 21–32. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-21-32 (In Russ.)]
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341–388. [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoi khimii = Advances in Biochemistry*, 2009, vol. 49, pp. 341–388. (In Russ.)]
3. Куртасова Л.М., Зуков Р.А., Семенов Э.В. Особенности хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у онкоурологических больных в динамике заболевания // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 6. С. 589–594. [Kurtasova L.M., Zukov R.A., Semenov E.V. Features of chemiluminescence of peripheral blood neutrophils in oncurologic patients in the course of the disease dynamics. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 589–594. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-589-594 (In Russ.)]
4. Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Шмидт А.Р. Клеточная чувствительность к интерферону- $\alpha 2$ in vitro у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 79–84. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Schmidt A.R. In vitro cellular response to interferon- $\alpha 2$ in children with infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-79-84 (In Russ.)]
5. Патент 2293988 Российская Федерация. Способ оценки чувствительности к интерферону у больных раком почки / Куртасова Л.М., Шкапова Е.А., Савченко А.А., Крыжановский А.И., Зуков Р.А., Рачкова Н.В. Заявители и патентообладатели: ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАН, Красноярский краевой онкологический диспансер; заявл. 10.09.2005; опубл. 20.02.2007 [Patent 2293988 Russian Federation. Method for assessing sensitivity to interferon in patients with kidney cancer / Kurtasova L.M., Shkapova E.A., Savchenko A.A., Kryzhanovskii A.I., Zukov R.A., Rachkova N.V. Applicants and patent holders: State Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk Regional Oncology Center; stat. 10.09.2005; publ. 20.02.2007]
6. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 5. С. 475–482. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Gvozdev I.I. Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent peritonitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 5, pp. 475–482. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482 (In Russ.)]
7. Патент 2620560 Российская Федерация. Способ прогнозирования развития абдоминального сепсиса у больных с распространенным гнойным перитонитом / Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Заявители и патентообладатели: ФИЦ КНЦ СО РАН; заявл. 10.11.2015; опубл. 26.05.2017 [Patent 2620560 Russian Federation. A method for predicting the development of abdominal sepsis in patients with advanced purulent peritonitis / Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Gvozdev I.I. Applicants and patent holders: FIC KNTS SO RAN; stat. 10.11.2015; publ. 26.05.2017]
8. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Кудрявцев И.В., Мошев А.В., Гвоздев И.И., Тоначева О.Г. Особенности взаимосвязи фенотипа и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком почки // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 259–268. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V., Gvozdev I.I., Tonacheva O.G. Phenotypic features and chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in the patients with renal cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 259–268. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-259-268 (In Russ.)]
9. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошечев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 2. С. 141–150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150 (In Russ.)]

10. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitoveckiy D.E., Borisov A.G. The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis. Novosibirsk: Nauka, 2013. 142 p.]
11. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12, № 1–2. С. 115–119. [Savchenko A.A., Zdzitoveckiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, vol. 12, no. 1–2, pp. 115–119. (In Russ.)]
12. Смирнова О.В., Титова Н.М., Каспаров Э.В., Елманова Н.Г. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании механической желтухи в зависимости от уровня билирубина и генеза желтухи // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 269–278. [Smirnova O.V., Titova N.M., Kasparov E.W., Yelmanova N.G. Chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in progression of obstructive jaundice depending on its origin and bilirubin levels. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 269–278. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-269-278 (In Russ.)]
13. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология. М.: Магистр-Пресс, 2013. 448 с. [Chereshnev V.A., Shmagel' K.V. Immunology [Immunology]. Moscow: Magistr-Press, 2013. 448 p.]
14. Allen R.C. Neutrophil leukocyte: combustive microbicidal action and chemiluminescence. *J. Immunol. Res.*, 2015, vol. 2015, 11 p. doi: 10.1155/2015/794072
15. Aranda A., Sequedo L., Tolosa L., Quintas G., Burello E., Castell J.V., Gombau L. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro*, 2013, vol. 27, iss. 2, pp. 954–963. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.016
16. Back P., Matthijssens F., Vanfleteren J.R., Braeckman B.P. A simplified hydroethidine method for fast and accurate detection of superoxide production in isolated mitochondria. *Anal. Biochem.*, 2012, vol. 423, no 1, pp. 147–151. doi: 10.1016/j.ab.2012.01.008
17. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, 2004, vol. 40, iss. 12, pp. 845–859. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005
18. Broxton C.N., Culotta V.C. SOD enzymes and microbial pathogens: surviving the oxidative storm of infection. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 1: e1005295. doi: 10.1371/journal.ppat.1005295
19. Chae C.S., Teran-Cabanillas E., Cubillos-Ruiz J.R. Dendritic cell rehab: new strategies to unleash therapeutic immunity in ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2017, vol. 66, iss. 8, pp. 969–977. doi: 10.1007/s00262-017-1958-2
20. Chio I.I.C., Tuveson D.A. ROS in cancer: the burning question. *Trends Mol. Med.*, 2017, vol. 23, iss. 5, pp. 411–429. doi: 10.1016/j.molmed.2017.03.004
21. Cooper E.L. From Darwin and Metchnikoff to Burnet and beyond. *Contrib. Microbiol.*, 2008, vol. 15, pp. 1–11. doi: 10.1159/000135680
22. Dehne N., Mora J., Namgaladze D., Weigert A., Brüne B. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2017, vol. 35, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.coph.2017.04.007
23. Dzik J.M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim. Pol.*, 2010, vol. 57, no. 4, pp. 443–466.
24. Folkes L.K., Patel K.B., Wardman P., Wrona M. Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2009, vol. 484, iss. 2, pp. 122–126. doi: 10.1016/j.abb.2008.10.014
25. Granot Z., Jablonska J. Distinct functions of neutrophil in cancer and its regulation. *Mediators Inflamm.*, 2015, vol. 2015, 11 p. doi: 10.1155/2015/701067
26. Haselmayer P., Tenzer S., Kwon B.S., Jung G., Schild H., Radsak M.P. Herpes virus entry mediator synergizes with Toll-like receptor mediated neutrophil inflammatory responses. *Immunology*, 2006, vol. 119, no. 3, pp. 404–411. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02449.x
27. Havixbeck J.J., Wong M.E., More Bayona J.A., Barreda D.R. Multi-parametric analysis of phagocyte antimicrobial responses using imaging flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 2015, vol. 423, pp. 85–92. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.016
28. Hosaka S., Obuki M., Nakajima J., Suzuki M. Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence. *Luminescence*, 2005, vol. 20, iss. 6, pp. 419–427. doi: 10.1002/bio.867
29. Ichibangase T., Ohba Y., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N. Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂. *Luminescence*, 2014, vol. 29, iss. 2, pp. 118–121. doi: 10.1002/bio.2513
30. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts II L.J., Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, vol. 52, iss. 1, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
31. Kalyanaraman B., Dranka B.P., Hardy M., Michalski R., Zielonka J. HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes — the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1840, iss. 2, pp. 739–744. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.008
32. Koul M., Kumar A., Deshidi R., Sharma V., Singh R.D., Singh J., Sharma P.R., Shah B.A., Jaglan S., Singh S. Cladosporol A triggers apoptosis sensitivity by ROS-mediated autophagic flux in human breast cancer cells. *BMC Cell Biol.*, 2017, vol. 18, no. 26, 15 p. doi: 10.1186/s12860-017-0141-0
33. Lyublinskaya O.G., Zenin V.V., Shatrova A.N., Aksenov N.D., Zemelko V.I., Domnina A.P., Litanyuk A.P., Burova E.B., Gubarev S.S., Negulyaev Y.A., Nikolsky N.N. Intracellular oxidation of hydroethidine: compartmentalization and cytotoxicity of oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, vol. 75, pp. 60–68. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.008
34. Maeda H., Yamamoto K., Nomura Y., Kohno I., Hafi L., Ueda N., Yoshida S., Fukuda M., Fukuyasu Y., Yamauchi Y., Itoh N. A design of fluorescent probes for superoxide based on a nonredox mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, no 1, pp. 68–69. doi: 10.1021/ja047018k

35. Mechnikov I.I. Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev. Infect. Dis.*, 1988, vol. 10, no 1, pp. 223–227.
36. Pliyev B.K., Shmidt E.I., Ivanova A.V., Menshikov M. Circulating CD35⁻/CD49d⁺ neutrophils in influenza virus infection patients. *Hum. Immunol.*, 2012, vol. 73, no 11, pp. 1087–1090. doi: 10.1016/j.humimm.2012.07.327
37. Ramanathan S., Jagannathan N. Tumor associated macrophage: a review on the phenotypes, traits and functions. *Iran J. Cancer Prev.*, 2014, vol. 7, no 1, pp. 1–8.
38. Robinson K.M., Janes M.S., Beckman J.S. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat. Protoc.*, 2008, vol. 3, no 6, pp. 941–947. doi:10.1038/nprot.2008.56
39. Saengmuang P., Kewcharoenwong C., Tippayawat P., Nithichanon A., Buddhisa S., Lertmemongkolchai G. Effect of host factors on neutrophil functions in response to *Burkholderia pseudomallei* in healthy Thai subjects. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 67, no 6, pp. 436–440.
40. Scharn C.R., Collins A.C., Nair V.R., Stamm C.E., Marciano D.K., Graviss E.A., Shiloh M.U. Heme oxygenase-1 regulates inflammation and mycobacterial survival in human macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, no 11, pp. 4641–4649. doi: 10.4049/jimmunol.1500434
41. Sikora J.P., Chlebna-Sokół D., Andrzejewska E., Chrul S., Polakowska E., Wysocka A., Sikora A. Clinical evaluation of pro-inflammatory cytokine inhibitors (sTNFR I, sTNFR II, IL-1 ra), anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) and activation of neutrophils after burn-induced inflammation. *Scand. J. Immunol.*, 2008, vol. 68, iss. 2, pp. 145–152. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02126.x
42. Sirokmány G., Donkó Á., Geiszt M. Nox/Duox family of NADPH oxidases: lessons from knockout mouse models. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016, vol. 37, iss. 4, pp. 318–327. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.006
43. Talib J., Maghzal G.J., Cheng D., Stocker R. Detailed protocol to assess in vivo and ex vivo myeloperoxidase activity in mouse models of vascular inflammation and disease using hydroethidine. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 97, pp. 124–135. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.004
44. Tripathi S., Wang G., White M., Rynkiewicz M., Seaton B., Hartshorn K. Identifying the critical domain of LL-37 involved in mediating neutrophil activation in the presence of influenza virus: functional and structural analysis. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no 8:e0133454. doi: 10.1371/journal.pone.0133454
45. Vowells S.J., Sekhsaria S., Malech H.L., Shalit M., Fleisher T.A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 178, no 1, pp. 89–97.
46. Wang J., Xu M., Chen M., Jiang Z., Chen G. Study on sonodynamic activity of metallophthalocyanine sonosensitizers based on the sonochemiluminescence of MCLA. *Ultrason. Sonochem.*, 2012, vol. 19, no 2, pp. 237–242. doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.06.021
47. Wang Y., Wang W., Xu H., Sun Y., Sun J., Jiang Y., Yao J., Tian Y. Non-lethal sonodynamic therapy inhibits atherosclerotic plaque progression in apoE^{-/-} mice and attenuates ox-LDL-mediated macrophage impairment by inducing heme oxygenase-1. *Cell Physiol. Biochem.*, 2017, vol. 41, no. 6, pp. 2432–2446. doi: 10.1159/000475913
48. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, vol. 43, iss. 7, pp. 995–1022. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.026
49. Wardman P. Methods to measure the reactivity of peroxyxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines. *Methods Enzymol.*, 2008, vol. 441, pp. 261–282. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01214-7
50. Zielonka J., Kalyanaraman B. Hydroethidine- and mitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, vol. 48, iss. 8, pp. 983–1001. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028
51. Zielonka J., Lambeth J.D., Kalyanaraman B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, vol. 65, pp. 1310–1314. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.017

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель 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;
Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, 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;
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;
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.

Поступила в редакцию 07.09.2017
 Принята к печати 20.09.2017

Received 07.09.2017
 Accepted 20.09.2017

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМА ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ С РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.В. Шабалдин^{1,2}, Е.В. Шабалдина¹, А.С. Симбирцев³

¹ ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия

³ ФГБУП НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследования метагенома верхних отделов респираторного тракта у детей показали присутствие пяти основных бактериальных филумов: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria*. Выявлены популяционные различия в распределении удельных весов выше перечисленных филумов, но с обязательным доминированием *Firmicutes*. Доказана роль факторов окружающей среды и времени года на представительство в этих биотопах филумов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*. Рецидивирующие респираторные инфекции, гипертрофия миндалин лимфоидного глоточного кольца, секреторные средние отиты у детей ассоциированы с носительством *Haemophilus (H.) parainfluenzae*, *H. paraphrohaemolyticus*, *Gemella (G.) haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. sanguinis*, *Streptococcus (S.) pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*.

Ключевые слова: дисбиоз верхних дыхательных путей, бактериальные филумы, гипертрофия миндалин лимфоидного глоточного кольца.

FEATURES OF THE MICROBIOME OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT IN CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY DISEASES

Shabaldin A.V.^{a,b}, Shabaldina E.V.^a, Simbirtsev A.S.^c

^a Kemerovo State Medical Academy of Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation

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

^c State Research Institute of Highly Pure Biopreparations FMBA of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Studies of the metagenome of the upper respiratory tract in children showed the presence of five major bacterial phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Fusobacteria*. Were revealed population differences in the distribution of weights of the above listed phyla, but subject to the dominance of the *Firmicutes*. Proved the role of environmental factors and time of year for representation in these biotopes of the phyla: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*. Recurrent respiratory infections, hypertrophy of the tonsils of the lymphoid pharyngeal ring, secretory middle ear infections in children is associated with carriage of *Haemophilus (H.) parainfluenzae*, *H. paraphrohaemolyticus*, *Gemella (G.) haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. sanguinis*, *Streptococcus (S.) pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*.

Key words: dysbiosis of the upper respiratory tract, bacterial phyla, hypertrophy of the tonsils of the lymphoid pharyngeal ring.

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6,
ФГБНУ НИИ комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний.
Тел.: (3842) 39-64-29 (служебн.); 8 951 163-90-11 (моб.).
E-mail: weit2007@ya.ru

Contacts:

Andrey V. Shabaldin
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd., 6,
Scientific Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases.
Phone: +7 (3842) 39-64-29 (office); +7 951 163-90-11 (mobile).
E-mail: weit2007@ya.ru

Библиографическое описание:

Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Симбирцев А.С. Особенности микробиома верхних отделов респираторного тракта у детей с рецидивирующими респираторными заболеваниями // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 341–349. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-341-349

Citation:

Shabaldin A.V., Shabaldina E.V., Simbirtsev A.S. Features of the microbiome of the upper respiratory tract in children with recurrent respiratory diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 341–349. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-341-349

© Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Симбирцев А.С., 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-341-349>

Микробиом респираторного тракта у детей с рецидивирующими респираторными заболеваниями и гипертрофией миндалин лимфоидного глоточного кольца продолжает активно изучаться [20]. Современные методы высокопродуктивного секвенирования и наличие открытых баз данных микроорганизмов (NCBI/BLAST) позволяют расширить представления о вкладе облигатных анаэробных бактерий в формирование данного микробиоценоза.

Dickson R.P. (2014) акцентирует внимание на том, что воспаление при хронических заболеваниях респираторного тракта активно поддерживается дисбиотическими нарушениями на его слизистых оболочках, и обозначает это состояние как «Dysbiosis-Inflammation Cycle» [24]. Особое значение автор вкладывает в цикличность процесса (своеобразного замкнутого патологического круга), где дисбиоз поддерживает воспаление, а воспаление — дисбиоз, что в итоге выражается в пролонгации локального воспаления. Соответственно пролонгированное воспаление на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и в миндалинах лимфоидного глоточного кольца будет клинически проявляться хроническим ринитом, риносинуситом, отитом, аденоидными вегетациями, гипертрофией небных миндалин, хроническим тонзиллофарингитом, ларингитом, бронхиальной астмой, бронхоэктатической болезнью [17, 24, 25, 40]. Эта патология доминирует в диспансерной группе часто и длительно болеющих детей (ЧБД) [1, 4, 7]. Доказано, что повторяющиеся респираторные инфекции также ассоциированы с изменениями микробиома верхних дыхательных путей [48]. Можно предположить, что Dysbiosis-Inflammation Cycle является ключевым звеном патогенеза постоянно повторяющихся респираторных инфекций у детей, через которое может происходить трансформация рецидивирующих инфекционных заболеваний респираторного тракта в хронические заболевания ЛОР-органов и респираторного тракта.

Современные эпидемиологические исследования показали, что частота детей с постоянно рецидивирующими респираторными инфекциями остается высокой уже более 40 лет и находится в пределах 10–50% детей раннего и дошкольного возраста [5, 8].

С этих позиций поиск с помощью современных методов метагеномного анализа управляемых микробиологических факторов в микроэкологии респираторного тракта ребенка, через которые Dysbiosis-Inflammation Cycle был бы ингибирован, является приоритетной задачей современной педиатрической фармакологии [23, 34].

Учитывая выше сказанное, целью настоящей работы было изучение современных лите-

ратурных данных о таксономии микробиоты верхних дыхательных путей у здоровых детей, у детей с патологией респираторного тракта, а также оценка способов патогенного влияния на организм ребенка некоторых представителей микробиоты верхних дыхательных путей.

Для выполнения поставленной цели был проведен анализ литературных данных, посвященных микроэкологии верхних дыхательных путей у здоровых детей и у детей с респираторной патологией. Поиск литературных источников проводился по следующим ключевым словам и выражениям: dysbiosis, microbiome, inflammation, upper respiratory tract, adenoid hypertrophy, hypertrophic tonsils, 16S rRNA, fingerprinting of prokaryotic, pyrosequencing, а также их сочетания. Основными сайтами, через которые проводился поиск, были <https://scholar.google.ru> и <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Современные методы и подходы в исследовании микрофлоры верхних дыхательных путей

В современных исследованиях микробиома человека широко используется анализ переменных участков гена 16s rRNA [2, 3, 14]. Данный анализ проводится различными способами: высокопродуктивным секвенированием (high-throughput sequencing) с помощью различных методических подходов (Illumina, SOLiD, 454, Ion Torrent и другие), микрочиповой технологией, в основе которой лежит ДНК-ДНК гибридизация (DNA microarrays), фрагментным ДНК-анализом (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, Amplified Fragment Length Polymorphism, Random Amplification of Polymorphic DNA — PCR). Применяются также и косвенные методы оценки бактериального разнообразия (Denaturing Gel Electrophoresis, Single-strand conformation polymorphism analysis), позволяющие определить бактериальный фингерпринт в той или иной микроэкосистеме [3].

Нуклеотидные последовательности 16S рибосомальных РНК всех известных бактерий и архей общедоступны в открытых базах данных NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes).

Микрофлора верхних дыхательных путей у здоровых детей и при респираторной патологии

С 2008 г. запущен международный проект «Микробиом человека» (Human Microbiome Project — НМП), задачей которого явилось всестороннее изучение микробных сообществ

в различных участках тела человека с помощью современных методов метагеномного анализа (<http://hmpdacc.org/overview/about.php>). Авторы проекта планируют получить беспрецедентную информацию о сложности микробных сообществ. В рамках этого проекта был проведен метагеномный анализ (более 1 млн секвенированных) отделяемого носа и глотки здоровых индивидуумов. Показано доминирование 5 основных бактериальных филумов (типов): *Firmicutes* (44%), *Proteobacteria* (41%), *Bacteroidetes* (11%), *Actinobacteria* (3%) и *Fusobacteria* (около 1%) [16].

Исследования Gao Zh. (2014) выявили, что доминирующим филумом в носоглоточном биотопе у здоровых индивидуумов являются *Bacteroides* (48%) и *Firmicutes* (32%), а на *Proteobacteria* приходится не более 10% [27].

На сопоставимость удельных весов *Bacteroides* (10–22%) и *Proteobacteria* (15–31%), с одной стороны, и доминирование *Firmicutes* (35–65%) в микробиоценозе носоглотки у здоровых людей, с другой, указывают и консорциумные исследования в Европейских странах [47].

Сравнительные исследования метагенома носоглотки здоровых детей выявили некоторые отличия от взрослых индивидуумов по распределению удельных весов основных бактериальных типов: *Proteobacteria* (64%), *Firmicutes* (21%), *Bacteroidetes* (11%), *Actinobacteria* (3%) и *Fusobacteria* (1,4%) [46]. Авторы считают, что микробиом верхних дыхательных путей изменяется с возрастом, в том числе и за счет увеличения гетерогенности родов [46].

Исследования микробиоценоза носа и глотки у детей показали следующее таксономическое распределение в классификационной цепочке тип-класс-порядок-семейство-род: филум — *Bacteroidetes*, класс — *Bacteroidia*, порядок — *Bacteroidales*; филум — *Firmicutes*, класс — *Bacilli*, порядки: *Bacillales*, *Lactobacillales*, *Staphylococcaceae*, класс — *Clostridia*, порядок — *Clostridiales*, семейство — *Peptococcaceae* и род — *Desulfotomaculum*, а также семейство — *Clostridiaceae* и род — *Clostridium*, класс — *Mollicutes*, порядок — *Mycoplasmatales*, семейство — *Mycoplasmataceae* и род — *Mycoplasma*; филум — *Proteobacteria*, класс — *Gammaproteobacteria*, различные порядки и семейства родов: *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Beggiatoa*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*; филум — *Actinobacteria*, класс — *Actinobacteria*, различные порядки и семейства родов: *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Bifidobacterium*; филум — *Fusobacteria*, класс — *Fusobacteria*, порядок — *Fusobacteriales*, семейство — *Fusobacteriaceae* и род — *Fusobacterium* [18].

В основных бактериальных филумах *Bacteroides* и *Firmicutes* верхних отделов респираторного тракта детей выявлено доминирование

следующих родовых представителей: *Prevotella*, *Veillonella* и *Streptococcus* [46]. Кроме того, у здоровых детей может обнаруживаться филум *Chlamydiae*, класс *Chlamydiae*, семейство *Chlamydiaceae*, род *Chlamydia* [42].

Показан феномен сезонной микроэкологической динамики. Так, выявлено, что с осени к весне в носоглотке у здоровых детей удельный вес *Proteobacteria* меняется с 71 на 51%; *Fusobacteria* — с 14 на 2%, а *Bacteroidetes* — с 19 на 3%, в то время как удельный вес *Firmicutes* увеличивается с 45 до 85% [20].

Изучение бактериального разнообразия на гипертрофированной глоточной миндалине у детей с помощью мультиплексного пиросеквенирования V1-V2 гипервариабельных регионов гена 16S rRNA показало доминирование семи основных филумов: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*. У этих детей были выявлены новые таксоны (кандидаты в новые филумы) TM7 и SR1 [41]. Удельный вес основных филумов распределялся следующим образом: *Firmicutes* (45,4%), *Proteobacteria* (28,6%) и *Fusobacteria* (11,1%). Авторы отмечают, что 3,2% нуклеотидных последовательностей были не классифицированы, что может отражать новые бактериальные таксоны [41]. Идентифицированными оказались 94 рода различных бактерий, персистирующих на глоточной миндалине. Основными представителями были: *Streptococcus* (18,0%), *Staphylococcus* (14,7%), *Haemophilus* (11,2%), *Fusobacterium* (10,4%), *Moraxella* (5,7%), *Prevotella* (4,1%), *Gemella* (2,8%), *Neisseria* (2,7%), *Corynebacterium* (2,3%), *Granulicatella* (1,4%) и *Pseudomonas* (1,3%).

В то же время показано выраженное разнообразие соотношений различных филумов в биотопе глоточной миндалины у детей с ее гипертрофией. Проведенный кластерный анализ по распределению филумов в микроэкосистеме глоточной миндалины позволил выделить 5 кластеров. В первом кластере доминировали *Firmicutes*, во втором — соотношение *Firmicutes* и *Proteobacteria* было равным, в третьем — доминировали *Proteobacteria*, в четвертом — основными представителями глоточного биотопа были *Fusobacterium*, в пятом — соотношение этих трех филумов и филумов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* было сопоставимо. О высоком разнообразии бактериального пейзажа на аденоидных вегетациях указывает показатель сходства микробиоты Чоу–Жаккарда [22]. Для аденоидных вегетаций он составил 0,26 (пределы 0–1,0).

Исследования назофарингеальной микробиоты у часто и длительно болеющих детей раннего возраста и у детей с острым синуситом в штате Висконсин (США) идентифици-

рвали 951 таксон из семейств *Rickenellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Moraxellaceae*, а также несколько неклассифицированных представителей филума *Proteobacteria*. В этой работе было показано, что постоянно рецидивирующие респираторные инфекции связаны с уменьшением таксономического разнообразия назофарингеальной микробиоты, но ассоциаций этого преморбидного фона детей с конкретными таксонами не выявлено. В то же время для острого синусита у детей раннего возраста показана достоверная положительная ассоциация с *Moraxella nonliquefaciens* [43].

У детей с рецидивирующими респираторными инфекциями и хроническим тонзиллитом в криптах небных миндалин доминировал род *Streptococcus* (*S.*) и следующие его виды: *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. intermedius* — а также из группы пиогенных стрептококков: *S. pyogenes*, *S. agalactiae* и *S. dysgalactiae* subsp. *equisimil* [28, 39].

Показано, что у детей с хроническим тонзиллитом и/или гипертрофией небных миндалин, помимо пяти основных филумов (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Fusobacteriia*), появляется и шестой — *Spirochaetes* [29]. Более детальное таксономическое исследование выявило 12 основных родов характерных для детей с хроническим тонзиллитом и/или гипертрофией небных миндалин: *Actinomyces*, *Rothia*, *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Johnsonella*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Neisseria* и *Haemophilus*. В этой работе было показано, что у детей с хроническим тонзиллитом и гипертрофией миндалин лимфоидного глоточного кольца выявлялись следующие виды бактерий: *Haemophilus* (*H.*) *haemolyticus*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. paraphrohaemolyticus*, *Gemella* (*G.*) *haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. sanguinis*. Причем у детей с гипертрофией миндалин лимфоидного глоточного кольца уровень инфицирования крипт небных миндалин *H. parainfluenzae*, *H. paraphrohaemolyticus*, *G. haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. sanguinis* был выше, чем у детей с хроническим тонзиллитом. Кроме того, у детей с хроническим тонзиллитом в биотопе крипт небных миндалин идентифицировали бактерии рода *Neisseria* (*N.*): *N. cineria*, *N. flavescens* и *N. elongata/Kingella denitrificans* [29].

Исследование метагенома содержимого крипт миндалин лимфоидного глоточного кольца с помощью технологий high-throughput sequencing позволило обнаружить и некультивируемые бактерии в этом биотопе у детей с их гипертрофией: *Porphyromonas genomospecies PAJ1*, *Tannerella genomospecies TAJ1*, *Abiotrophia genomospecies AAJ1*, *Fusobacterium genomospecies designated FAJ1* и *FAJ2* [29, 44].

Тем самым секвенирование метагенома глоточного биотопа вносит существенное дополнение о разнообразии факультативных и облигатных анаэробных бактерий у здоровых детей и детей с патологией лимфоидного глоточного кольца.

Особое значение в формировании дисбиоза верхних дыхательных путей и активации пролонгированного воспаления имеют и интегрированные вирусные геномы [33]. Анализ метагенома дыхательных путей у пациентов с рецидивирующей респираторной патологией с помощью ДНК-/РНК-препарации и 454-пиросеквенирования позволил выделить бактериальные, вирусные, аутосомные (принадлежащие человеку) и недифференцированные контиги [35]. Показано, что удельный вес выделенных вирусных контиг составляет более 40%, что сопоставимо с бактериальными. В то же время идентифицировать вирусные геномы с помощью NCBI/Blast удалось в 4% случаев. В расшифрованном вирусном контенте доминировали *Paramyxoviridae* (38%), далее *Picornaviridae* (31%) и *Orthomyxoviridae* (21%). В семействе *Paramyxoviridae* в 80% случаев выделялись человеческие респираторно-синцитиальные вирусы (hRSV), в семействе *Picornaviridae* доминировали риновирусы А (65%) и риновирусы С (35%), а в семействе *Orthomyxoviridae* 96% контиг были гомологичны геному вируса гриппа А [35]. Представленные результаты согласуются с данными других исследователей, посвященных вирусной составляющей метагенома дыхательных путей человека [26, 35].

Тем самым, интегрированные в метагеном дыхательных путей вирусы могут вносить существенное значение в поддержании воспаления и дисбиоза.

Механизмы формирования дисбиоза верхних дыхательных путей у детей и реализация патогенного влияния микробиоты на организм ребенка

Интеграция макроорганизма и микроорганизмов базируется на принципе саморегуляции, в основе которой лежат межклеточные контакты, в том числе бактериальных и аутосомных клеток. Между микробиомом и аутогеномом существуют тесные взаимосвязи, которые обозначаются как гено-метаболические сети, определяющие жизнедеятельность человека и микроорганизмов [6]. Особое значение микробиоты человека связано с эпигенетическим модулированием генетически детерминированных процессов [31, 47].

Микробиоценоз респираторного тракта формируется в перинатальный и неонатальный

периоды, в том числе и за счет приобретения микрофлоры родовых путей матери. Исследования сопоставимости микробиома носовых ходов новорожденных детей и их матерей с помощью амплификации гена бактериального шаперона-60 (срп60) показало наличие не более пяти общих для матерей и их детей родов из филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria* [38]. Причем авторы показали прогрессивное изменения микробиома носоглотки ребенка в течении первого года жизни. Кроме того было выявлено, что соотношение филумов и родов носоглоточного микробиома младенцев было наиболее близко к материнскому в двухмесячном возрасте. В этот период доминирующими филумами и родами были *Actinobacteria* (рода *Corynebacterium*, *Rhodococcus* и *Propionibacterium*); *Firmicutes* (основные рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Dolosigranulum* и *Veillonella*), и *Proteobacteria* (основной род *Moraxella*). Причем удельный вес рода *Dolosigranulum* в микробиоме носоглотки детей в этот период достигал 60%. Но к концу первого года жизни в носоглотке доминировал род *Staphylococcus* (46%).

Показано, что рождение детей методом кесарева сечения, недоношенность, трансплцентарные инфекции, длительное нахождение детей на аппарате искусственной вентиляции легких, применение антибиотиков в ранний неонатальный период, раннее искусственное вскармливание меняют микроэкологию носоглотки в сторону увеличения представителей условно-патогенной микрофлоры, а также к увеличению общего числа таксонов к концу первого года жизни, оцененных по метабеномному профилю [36, 45].

Исследователи, изучающие динамику в микробиоме носоглоточного биотопа у детей первого года жизни, отмечают прогрессивное увеличение в течение года представителей условно-патогенной микрофлоры *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis* [21, 38]. Причем только для *Staphylococcus aureus* показана положительная корреляция с материнским носоглоточным биотопом.

Кроме того, доказано, что геномы прокариот являются чрезвычайно динамичными в пределах одного вида за счет гибких, вспомогательных (чаще всего операционных) генов [6, 14]. Важное значение в формировании динамичности генома прокариот имеют такие генетические структуры как мобильные элементы, плазмиды, интегроны, профаги, CRISPR-локусы, различные регуляторные элементы. Причем данные генетические элементы могут переносить генетический материал, как внутри одной бактериальной клетки, так и от прокариоты к прокариоте и от прокариоты к эукариоте [6]. Генетическая мобильность прокариот, в том числе и за счет бак-

териально-вирусных и вирусно-вирусных фагов, может быть дополнительным условием формирования дисбиоза верхних дыхательных путей у детей в постнатальном периоде [37].

Представители рода *Staphylococcus*, семейства *Staphylococcaceae* (класс *Bacilli*, филум *Firmicutes*) имеют ряд факторов патогенности: адгезины (взаимодействия со слизистой), капсула (защита от фагоцитоза), белок А (неспецифическое связывание Fc-фрагмента молекул IgG, свойства суперантигена), ферменты — β -лактамаза, коагулаза (образование фибриновой пленки, защищающей микроорганизм), а также гиалуронидаза, дезоксирибонуклеаза, фибринолизин, стафилокиназа [32]. Антигенам стафилококка присуща еще одна характерная способность — либерация гистамина. Наличие у представителей семейства *Staphylococcaceae* суперантигенов и способности к либерации гистамина является основой для развития аллергического воспаления.

Другие представители транзитной микрофлоры носоглоточного биотопа детей (рода *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*) могут образовывать клинически значимые количества гистамина и через это быть триггерами атопического воспаления и патологии носа, глотки и бронхов [32].

Тем самым, описанный выше *Dysbiosis-Inflammation Cycle* [25] может манифестировать с первичного дисбиоза носоглотки [47, 48], развившегося с участием материнского микроокружения, способа родоразрешения, патологии перинатального периода, особенностей вскармливания на первом году жизни и факторов макроокружения (в том числе вирусной нагрузки на ребенка) [37].

Одним из ярких клинических проявлений роли пролонгированного аллергического воспаления, ассоциированного с первичными дисбиотическими нарушениями на слизистых оболочках носа и глотки, является гипертрофия миндалин лимфоидного глоточного кольца. Для данной патологии показано, в том числе и методами секвенирования метагенома крипт небных миндалин, увеличение массы условно-патогенной и патогенной микрофлоры из родов *Streptococcus* и *Haemophilus* [44]. Кроме того, нами показан высокий иммунный ответ по IgE-типу к представителям данных микробных родов, с одновременным увеличением провоспалительных цитокинов в назофарингеальном смыве, у детей с гипертрофией миндалин лимфоидного глоточного кольца [11, 12]. Таким образом не вызывает сомнения роль дисбиотических нарушений в формировании гипертрофии миндалин лимфоидного глоточного кольца у детей.

Практическое применение современных методов оценки микробиома верхних дыхательных путей у детей

Представленные выше научные результаты были получены с помощью высокопроизводительных методов секвенирования метагенома носа, глотки, крипт глоточных и небных миндалин. Данный методический подход актуален для научных исследований, в том числе и для внесения новых данных о нуклеотидных последовательностях тех или иных прокариот в соответствующие базы данных (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes). В то же время для рутинной диагностики дисбиоза верхних дыхательных путей требуются новые информативные методы молекулярно-генетической идентификации микроорганизмов, включая представителей облигатных анаэробов. Одним из таких методов является ПЦР-диагностика дисбиоза нижних отделов репродуктивного тракта женщин и мужчин (тест-система «Фемофлор», тест-система «Андрофлор», ООО «ДНК-технология», Москва). В данных тест-системах с помощью первичных праймеров происходит накопление варибельного участка гена 16S rRNA с дальнейшей мультипраймерной амплификацией родо- и видоспецифичных генетических маркеров дисбиоз-ассоциированных бактерий. На сегодняшний момент в отношении микробиома носоглотки детей раннего возраста еще не накоплены знания о роли облигатных анаэробных микроорганизмов в формировании Dysbiosis-Inflammation Cycle. Молекулярно-генетическое исследование лишь подтвердило значимость *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. pyogenes* и *Pseudomonas aeruginosa* в формировании патологии верхних дыхательных путей у детей [16]. С этих позиций мультипраймерная ПЦР может быть направлена на выявление генетических маркеров этих микроорганизмов.

Нами предложен другой методический подход для выявления дисбиоз-ассоциированных бактерий [9, 10]. Патентованный способ

основан на исследовании секреторных антител (с помощью иммуноферментного анализа) к антигенам прокариот глоточного биотопа (*Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. paraphrohaemolyticus*, *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. intermedius*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*) в назофарингеальном секрете. Известно, что индукция антител происходит в момент персистенции микроорганизма с последующей колонизацией новых биотопов слизистых оболочек человека [15]. Именно эта фаза является наиболее существенной для Dysbiosis-Inflammation Cycle и она связана с патогенезом хронических воспалительных заболеваний верхних отделов респираторного тракта у детей [24].

Тем самым актуальность создания эффективных тест-систем для диагностики дисбиоза верхних дыхательных путей у детей не вызывает сомнения. Ключевыми методическими подходами для их разработки могут быть молекулярно-генетические исследования микробиома глоточного биотопа, иммунного ответа на антигены доминирующих представителей дисбиоз-ассоциированных бактерий и особенностей их метаболизма.

Таким образом, исследование микробиома глоточного биотопа детей показало широкий диапазон колебаний удельных весов различных семейств и родов микроорганизмов пяти основных филумов: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria*.

Доказана роль факторов окружающей среды и времени года на представительство в верхних отделах респираторного тракта филумов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*.

Эффективная диагностика дисбиоза верхних дыхательных путей у детей может быть основой для специфической профилактики формирования хронической патологии респираторного тракта: гипертрофии миндалин лимфоидного глоточного кольца, хронического тонзиллита (и заболеваний, ассоциированных с ним), а также аллергической патологии носа, глотки, гортани и бронхов.

Актуальным является создание клинической тест-системы на основе молекулярно-генетических технологий для оценки дисбиоза верхних дыхательных путей у детей.

Список литературы/References

1. Альбицкий В.Ю., Баранов А.А. Часто болеющие дети. Клинико-социальные аспекты. Пути оздоровления. Саратов: Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 1986. 184 с. [Albitsky V.Yu., Baranov A.A. Chasto boleuyushchie deti. Kliniko-sotsial'nye aspekty. Puti ozdorovleniya [Frequently ill children. Clinical and social aspects. The road to recovery]. *Saratov: N.G. Chernyshevsky Saratov National Research University, 1986. 184 p.*]
2. Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Анализ полных геномов — очередной этап в развитии микробиологии // Вестник Российской академии наук. 2010. Т. 80, № 11. С. 977–984. [Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. Analysis of complete genome as successive stage in development of microbiology review. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences, 2010, vol. 80, no. 11, pp. 977–984. (In. Russ.)*]

3. Волкова Р.А., Сколетнева Е.С., Эльберт Е.В., Мыца Е.Д., Давыдов Д.С., Мовсесянц А.А., Меркулов В.А., Бондарев В.П., Борисевич И.В. Проблемы генотипирования микроорганизмов // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016. Т. 16, № 3 (59). С. 139–144. [Volkova R.A., Skoletneva E.S., El'bert E.V., Mytsa E.D., Davydov D.S., Movseyants A.A., Merkulov V.A., Bondarev V.P., Borisevich I.V. Genotyping problems of microorganisms. *BIO Preparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIO Preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2016, vol. 16, no. 3 (59), pp. 139–144. (In Russ.)]
4. Карпова Е.П., Тулупов Д.А. Хронический аденоидит у детей: пособие для врачей. М.: РМАПО, 2009. 54 с. [Karpova E.P., Tulupov D.A. *Khronicheskii adenoidit u detei: posobie dlya vrachei* [Chronic adenoiditis in children: manual for physicians]. *Moscow: Russian Medical Academy, 2009. 54 p.*]
5. Кушнарера М.В., Виноградова Т.В., Кешишян Е.С., Парфенов В.В., Кольцов В.Д., Брагина Г.С., Паршина О.В., Гусева Т.С. Особенности иммунного статуса и системы интерферона у детей раннего возраста // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, 2016. Т. 61, № 3. С. 12–21. [Kushnareva M.V., Vinogradova T.V., Keshishian E.S., Parfenov V.V., Koltsov V.D., Bragina G.S., Parshina O.V., Guseva T.S. Specific features of the immune status and interferon system of infants. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 12–21. doi: 10.21508/1027-4065-2016-61-3-12-21 (In Russ.)]
6. Раввин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 972–984. [Ravvin N.V., Shestakov S.V. The Genome of prokaryotes. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2013, vol. 17, no. 4/2, pp. 972–984. (In Russ.)]
7. Романцев М.Г., Ершов Ф.И. Часто болеющие дети: современная фармакотерапия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 192 с. [Romantsev M.G., Ershov F.I. *Chasto boleyushchie deti: sovremennaya farmakoterapiya* [Frequently ill children: modern pharmacotherapy]. *Moscow: GEOTAR-Media, 2006. 192 p.*]
8. Романцов М.Г., Мельникова И.Ю. Часто болеющие дети: вопросы фармакотерапии (научный обзор) // *Terra medica*. 2014. № 1. С. 55–69. [Romantsov M.G., Melnikova I.Yu. Sickly children: issues of pharmacotherapy (scientific review). *Terra Medica*, 2014, no. 1, pp. 55–69. (In Russ.)]
9. Патент 2576839 Российская Федерация. Способ диагностики дисбиотических нарушений в биоптатах слизистой носа и глотки у детей раннего и дошкольного возраста с постоянно рецидивирующими острыми респираторными инфекциями / Тюменев А.В., Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Рязанцев С.В., Симбирцев А.С. Заявители и патентообладатели: Тюменев А.В., Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Рязанцев С.В., Симбирцев А.С.; завл. 16.10.2013; опубл. 10.03.2016 [Patent 2576839 Russian Federation. A method for diagnosing dysbiotic disorders in biopsies of nasal mucosa and pharynx in children of early and preschool age with recurring acute respiratory infections / Tyumenev A.V., Shabaldina E.V., Shabaldin A.V., Ryazantsev S.V., Simbirtsev A.S. Applicants and patent holders: Tyumenev A.V., Shabaldina E.V., Shabaldin A.V., Ryazantsev S.V., Simbirtsev A.S.; stat. 10.16.2013; publ. 03.10.2016]
10. Патент 2569054 Российская Федерация. Способ определения провоспалительных и проаллергических интерлейкинов в назальном секрете у детей раннего и дошкольного возраста для диагностики этиологии рецидивирующих острых ринофарингитов и аденоидитов / Тюменев А.В., Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Симбирцев А.С., Рязанцев С.В. Заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ; заявл. 24.09.2013; опубл. 20.11.2014 [Patent 2569054 Russian Federation. Method for the determination of proinflammatory and proallergic interleukins in nasal secretion in children of early and preschool age for diagnosis of the etiology of recurrent acute rhinopharyngitis and adenoiditis / Tyumenev A.V., Shabaldina E.V., Shabaldin A.V., Simbirtsev A.S., Ryazantsev S.V. Applicant and patent holder: Kemerovo State Medical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation; stat. 24.09.2013; publ. 20.11.2014]
11. Шабалдина Е.В., Кутенкова Н.Е., Шабалдин А.В., Лисаченко Г.В. Особенности иммунного и цитокинового статусов у детей с гипертрофией лимфоидного глоточного кольца и сопутствующей аллергией к инфекционным антигенам // *Российская оториноларингология*. 2012. № 2. С. 118–123. [Shabalina E.V., Kutenkova N.E., Shabaldin A.V., Tikhonuk V.P., Lisachenko G.V. Characteristics of immune and cytokine status in children with hypertrophy of lymphoid pharyngeal ring and concomitant allergies to infectious antigens. *Rossiiskaya otorinolaringologiya* = *Russian Otorhinolaryngology*, 2012, no. 2, pp. 118–123. (In Russ.)]
12. Шабалдина Е.В., Кутенкова Н.Е., Шабалдин А.В., Тихонюк В.П., Лисаченко Г.В. Роль сенсибилизации к инфекционным антигенам в патогенезе рецидивирования острых респираторных инфекций у детей // *Педиатрия*. 2013. № 1. С. 24–33. [Shabalina E.V., Kutenkova N.E., Shabaldin A.V., Tikhonuk V.P., Lisachenko G.V. The role of sensitization to infectious antigens in the pathogenesis of recurrence of acute respiratory infections in children. *Pediatriya* = *Pediatrics*, 2013, no. 1, pp. 24–33. (In Russ.)]
13. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // *Экологическая генетика*. 2007. Т. 2, № 5. С. 12–24. [Shestakov S.V. How is and then is limited by horizontal gene transfer in bacteria. *Ekologicheskaya genetika* = *Ecological Genetics*, 2007, vol. 2, no. 5, pp. 12–24. (In Russ.)]
14. Шестаков С.В. Метагеномика микробиома человека // *Успехи современной биологии*. 2010. Т. 130, № 6. С. 531–543. [Shestakov S.V. Metagenomics of the human microbiome. *Uspekhi sovremennoi biologii* = *Advances in Current Biology*, 2010, vol. 130, no. 6, pp. 531–543. (In Russ.)]
15. Шеплягина Л.А. Секреторный иммунитет кишечника у детей раннего возраста // *Педиатрия*. 2011. № 3. С. 48–50. [Schepljagina L.A. Secretory immune system of the intestine at children of early age. *Pediatriya* = *Pediatrics*, 2011, no. 3, pp. 48–50. (In Russ.)]
16. Bassi C.M., Erb-Downward J.R., Dickson R.P., Freeman C.M., Schmidt T.M., Yong V.B., Beck J.M., Curtis J.L., Huffnagle G.B., Ravel J. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio*, 2015, vol. 6, no. 2: e00037-15. doi: 10.1128/mBio.00037-15
17. Benninger M., Brook I., Bernstein J.M., Casey J.R., Roos K., Marple B., Farrar J.R. Bacterial interference in upper respiratory tract infections: a systematic review. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2011, vol. 25, no. 2, pp. 82–88. doi: 10.2500/ajra.2011.25.3594

18. Biesbroek G., Tsvitsvadze E., Sanders E.A., Montijn R., Veenhoven R.H., Keijser B.J. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, vol. 190, no. 11, pp. 1283–1292. doi: 10.1164/rccm.201407-12400C
19. Bochkov Y.A., Grindle K., Vang F., Evans M.D., Gern J.E. Improved molecular typing assay for rhinovirus species A, B, and C. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 7, pp. 2461–2471. doi: 10.1128/JCM.00075-14
20. Bogaert D., Keijser B., Huse S., Rossen J., Veenhoven R., Van Gils E., Bruin J., Montijn R., Bonten M., Sanders E. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 17035–17043. doi: 10.1371/journal.pone.0017035
21. Bogaert D., van Belkum A., Sluiter M., Luijendijk A., de Groot R., Rumke H.C. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet*, 2004, vol. 363, iss. 9424, pp. 1871–1872. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16357-5
22. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 2009, vol. 326, iss. 5960, pp. 1694–1697. doi: 10.1126/science.1177486
23. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2013, vol. 7, iss. 3, pp. 245–257. doi: 10.1586/ers.13.24
24. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Martinez F.J., Huffnagle G.B. The microbiome and the respiratory tract. *Annu. Rev. Physiol.*, 2016, vol. 78, pp. 481–504. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105238
25. Dickson R.P., Martinez F.J., Huffnagle G.B. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*, 2014, vol. 384, iss. 9944, pp. 691–702. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61136-3
26. Edwards R.A., Rohwer F. Viral metagenomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, vol. 3, pp. 504–510. doi: 10.1038/nrmicro1163
27. Gao Z., Kang Y., Jun Y., Ren L. Human pharyngeal microbiome may play a protective role in respiratory tract infections. *Genom. Proteom. Bioinform.*, 2014, vol. 12, iss. 3, pp. 144–150. doi: 10.1016/j.gpb.2014.06.001
28. Hilty M., Burke C., Pedro H., Cardenas P., Bush A., Bossley C., Davies J., Ervine A., Poulter L., Pachter L., Moffatt M.F., Cookson W.O. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*, 2010, vol. 5, iss. 1, e:8578. doi: 10.1371/journal.pone.0008578
29. Jensen A., Fago-Olsen H., Sorensen C.H., Kilian M. Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 2: e56418. doi: 10.1371/journal.pone.0056418
30. Kononen E. Development of oral bacterial flora in young children. *Ann. Med.*, 2000, vol. 32, iss. 2, pp. 107–112. doi: 10.3109/07853890009011759
31. Kumar H., Lund R., Laiho A., Lundelin K., Ley R.E., Isolauri E., Salminen S. Gut microbiota as an epigenetic regulator: pilot study based on whole-genome methylation analysis. *MBio*, 2014, vol. 5, no. 6: e02113-14. doi: 10.1128/mBio.02113-14
32. Lebon A., Labout J.A., Verbrugh H.A., Jaddoe V.W., Hofman A., van Wamel W., Moll H.A., van Belkum A. Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 10, pp. 3517–3521. doi: 10.1128/JCM.00641-08
33. Lee W.-M., Grindle K., Pappas T., Marshall D.J., Moser M.J., Beaty E.L., Shult P.A., Prudent J.R., Gern J.E. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 8, pp. 2626–2634. doi: 10.1128/JCM.02501-06
34. Liu C.M., Cosetti M.K., Aziz M., Buchhagen J.L., Contente-Cuomo T.L., Price L.B., Keim P.S., Lalwani A.K. The otologic microbiome: a study of the bacterial microbiota in a pediatric patient with chronic serous otitis media using 16SrRNA gene-based pyrosequencing. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2011, vol. 137, no. 7, pp. 664–668. doi: 10.1001/archoto.2011.116
35. Lysholm F., Wetterbom A., Lindau C., Darban H., Bjerkner A., Fahlander K., Lindberg A.M., Persson B., Allander T., Andersson B. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 2: e30875. doi: 10.1371/journal.pone.0030875
36. Malygina O.G., Bazhukova T.A. Influence of antibiotics on formation of microecology in premature children with low and extremely low body weight at birth. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2014, no. 1, pp. 61–65. PMID: 24738296
37. Moore H.C., Jacoby P., Taylor A., Harnett G., Bowman J., Riley T.V., Smith D.W., Lehmann D. The interaction between respiratory viruses and pathogenic bacteria in the upper respiratory tract of asymptomatic aboriginal and non-aboriginal children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2010, vol. 29, iss. 6, pp. 540–545. doi: 10.1097/inf.0b013e3181d067cb
38. Peterson S.W., Knox N.C., Golding G.R., Tyler S.D., Tyler A.D., Mabon P., Embree J.E., Fleming F., Fanella S., van Domselaar G., Mulvey M.R., Graham M.R. A study of the infant nasal microbiome development over the first year of life and in relation to their primary adult caregivers using cpn60 universal target (UT) as a phylogenetic marker. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 3: e0152493. doi: 10.1371/journal.pone.0152493
39. Quintero B., Araque M., van der Gaast-de Jongh C., Escalona F., Correa M., Morillo-Puente S., Vielma S., Hermans P.W.M. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* colonization in healthy Venezuelan children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, vol. 30, iss. 1, pp. 7–19. doi: 10.1007/s10096-010-1044-6
40. Rajeswary A., Rai S., Somayaji G., Pai V. Bacteriology of symptomatic adenoids in children. *North Am. J. Med. Sci.*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 113–118. doi: 10.4103/1947-2714.107529
41. Ren T., Ulrike D.G., Nguyen T.N., Kaitlynn E.A., Early S.V., Sale M., Winther B., Wu M. 16S rRNA survey revealed complex bacterial communities and evidence of bacterial interference on human adenoids. *Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 15, no. 2, pp. 2–13. doi: 10.1111/1462-2920.12000
42. Sakwinska O., Schmid V.B., Berger B., Bruttin A., Keitel K., Lepage M., Moine D., Bru C.N., Brüßow H., Gervaix A. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 5, pp. 1590–1594. doi: 10.1128/JCM.03280-13
43. Santee C.A., Nagalingam N.A., Faruqi A.A., DeMuri G.P., Gern J.E., Wald E.R., Lynch S.V. Nasopharyngeal microbiota composition of children is related to the frequency of upper respiratory infection and acute sinusitis. *Microbiome*, 2016, vol. 4: 34. doi: 10.1186/s40168-016-0179-9

44. Scholz C.F., Poulsen K., Kilian M. Novel molecular method for identification of *Streptococcus pneumoniae* applicable to clinical microbiology and 16S rRNA sequence-based microbiome studies. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 6, pp. 1968–1973. doi: 10.1128/JCM.00365-12
45. Shiels M.H., Rosas-Salazar C., Tovchigrechko A., Larkin E.K., Torralba M., Akopov A., Halpin R., Peebles R.S., Moore M.L., Anderson L.J., Nelson K.E., Hartert T.V., Das S.R. Minimally invasive sampling method identifies differences in taxonomic richness of nasal microbiomes in young infants associated with mode of delivery. *Microb. Ecol.*, 2016, vol. 71, iss. 1, pp. 233–242. doi: 10.1007/s00248-015-0663-y
46. Stearns J.C., Davidson C.J., McKeon S., Whelan F.J., Fontes M.E., Schryvers A.B., Bowdish D.M., Kellner J.D., Surette M.G. Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *ISME J.*, 2015, no. 9, pp. 1246–1259. doi: 10.1038/ismej.2014.250
47. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. The Human Microbiome Project Consortium. *Nature*, 2012, vol. 486, no. 7402, pp. 201–214. doi: 10.1038/nature11234
48. Teo S.M., Mok D., Pham K., Kusel M., Serralha M., Troy N., Holt B.J., Hales B.J., Walker M.V., Hollams E., Bochkov Y.A., Grindle K., Johnston S.L., Gern J.E., Sly P.D., Holt P.G., Holt K.E., Inouye M. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host & Microbe*, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 704–715. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.008

Авторы:

Шабалдин А.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия; профессор кафедры оториноларингологии и клинической иммунологии ГБОУ ВПО Кемеровский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Кемерово, Россия;

Шабалдина Е.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой оториноларингологии и клинической иммунологии Кемеровской государственной медицинской академии, г. Кемерово, Россия;

Симбирцев А.С., член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; Professor of Department of Otolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation;

Shabaldina E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Otorhinolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director on Science of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.04.2017
Отправлена на доработку 17.05.2017
Принята к печати 27.06.2017

Received 17.04.2017
Revision received 17.05.2017
Accepted 27.06.2017

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОТДЕЛЕНИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

А.В. Любимова¹, С.А. Ряховских¹, Н.А. Шаляпина¹, Т.В. Бродина¹,
М.Ю. Аверьянова², Б.И. Асланов¹, В.В. Нечаев¹

¹ ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования: выявить эпидемиологические особенности бактериальных инфекций у пациентов и закономерности циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов в отделениях трансплантации костного мозга. **Материалы и методы.** Исследование проводилось на базе трех отделений трансплантации костного мозга. С целью выявления эпидемиологических особенностей бактериальных инфекций было проведено проспективное наблюдение с 01.04 по 31.08.14 года (91 пациент), которое включало активное выявление случаев инфекции и микробиологическое обследование пациентов. Для выявления циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов проводились исследования точечной превалентности (59 пациентов, 170 исследований объектов внешней среды). Для изучения значения колонизации проводился микробиологический мониторинг за колонизацией пациентов при поступлении в отделение, далее каждую неделю до выписки. Исследованию подлежали смывы с кожи и слизистой оболочки ротовой полости, кал. Выполнено 639 исследований от 50 пациентов. **Результаты:** в ходе исследования выявлена высокая частота инфекционных осложнений у пациентов отделений ТКМ (100 случаев бактериальных инфекционных осложнений у 57 пациентов: сепсис — 30,8 на 100 пациентов, пневмония — 26,4 на 100 пациентов, инфекции мочевыводящих путей — 32,9 на 100 пациентов, инфекции мягких тканей — 9,9 на 100 пациентов, катетер-ассоциированная инфекция кровотока — 9,9 на 100 пациентов). Большинство инфекций были вызваны грамотрицательными микроорганизмами, в частности *K. pneumoniae*. Началу клинических проявлений предшествовала колонизация пациента данными микроорганизмами. Летальные исходы наблюдались от сепсиса и пневмонии, вызванных *K. pneumoniae* и/или *P. aeruginosa*. Сепсис и пневмония возникали чаще на фоне цитопении RR 2,63 [95% ДИ 1,52–4,57] $p = 0,004$ и RR 3,97 [95% ДИ 2,19–7,19] $p < 0,001$ соответственно. В динамике частота колонизации пациентов чувствительными к антибиотикам микроорганизмами снижалась, а резистентными увеличивалась. Серия превалентных исследований выявила постоянную циркуляцию VRE в отделении с контактно-бытовым путем передачи через объекты бытового назначения. Мультирезистентные грамотрицательные микроорганизмы не имели постоянной циркуляции и появлялись эпизодически на фоне циркуляции чувствительных штаммов этих возбудителей. **Выводы.** Требуется внедрение проспективного эпидемиологического наблюдения и микробиологического мониторинга в отделениях данного профиля. Широкая контаминация бытовых объектов внешней среды пока-

Адрес для переписки:

Ряховских Светлана Александровна
195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47,
СЗГМУ им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 921 799-28-48 (моб.).
E-mail: svetaryahovskikh@list.ru

Contacts:

Svetlana A. Ryakhovskikh
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Piskarevskii pr., 47,
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov.
Phone: +7 921 799-28-48 (mobile).
E-mail: svetaryahovskikh@list.ru

Библиографическое описание:

Любимова А.В., Ряховских С.А., Шаляпина Н.А., Бродина Т.В.,
Аверьянова М.Ю., Асланов Б.И., Нечаев В.В. Эпидемиологические
особенности бактериальных инфекций в отделении трансплантации
костного мозга // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 350–358.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-350-358

Citation:

Lyubimova A.V., Ryakhovskikh S.A., Shalyapina N.A., Brodina T.V.,
Averyanova M.Yu., Aslanov B.I., Nechaev V.V. Epidemiological features
of bacterial infections in bone marrow transplant units // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4,
pp. 350–358. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-350-358

зывает необходимость усиления гигиенического обучения пациентов и посетителей, а также дезинфекции данных объектов. Кроме того, мы рекомендуем внедрение еженедельного обследования пациентов на носительство ММАР в кишечнике.

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, факторы-риска, ванкомицин-резистентные энтерококки, превалентность, молекулярно-генетическое типирование, трансплантация костного мозга.

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF BACTERIAL INFECTIONS IN BONE MARROW TRANSPLANT UNITS

Lyubimova A.V.^a, Ryakhovskikh S.A.^a, Shalyapina N.A.^a, Brodina T.V.^a, Averyanova M.Yu.^b, Aslanov B.I.^a, Nechaev V.V.^a

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

^b Institute of Pediatric Hematology and Transplantation named after R.M. Gorbacheva, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to identify the epidemiological features of bacterial infections in patients and circulation of epidemiologically significant microorganisms in the bone marrow transplant (BMT) units. *Materials and methods.* The study was conducted in three BMT departments. To identify the epidemiological features of bacterial infections, a prospective observational study was conducted from 01 April 2014 to 31 August 2014 (91 patients) which included active detection of cases of infection and microbiological examination of patients. In order to detect the circulation of epidemiologically significant microorganisms, point prevalence studies (59 patients, 170 environmental samples) were conducted. To study the role of colonization, microbiological monitoring of patients on admission to the department was carried out, and repeated every week before discharge. Swab samples from skin and mucous membrane of the oral cavity and stool samples were included in the monitoring. In total, 639 samples from 50 patients were tested. *Results.* The study revealed a high incidence of infectious complications in BMT patients (100 cases of bacterial infections in 57 patients: sepsis 30.8 per 100 patients, pneumonia 26.4 per 100 patients, urinary tract infections 32.9 per 100 patients, soft tissue infection 9.9 per 100 patients, catheter-associated bloodstream infection 9.9 per 100 patients). Most infections were caused by Gram-negative bacteria, in particular *K. pneumoniae*. The onset of disease manifestation was preceded by colonization of the patient with these microorganisms. Fatal outcomes were observed from sepsis and pneumonia caused by *K. pneumoniae* and/or *P. aeruginosa*. Sepsis and pneumonia were often associated with cytopenia, RR 2.63 [95% CI 1.52–4.57] $p = 0.004$ and RR 3.97 [95% CI 2.19–7.19] $p < 0.001$ respectively. In course of observation, the frequency of colonization of patients with microorganisms susceptible to antibiotics decreased, and colonization with resistant pathogens increased. A series of prevalence studies revealed a constant circulation of VRE in the BMT units with a contact-transmission via household objects. Multidrug-resistant gram-negative microorganisms did not have a constant circulation and appeared sporadically against the background of the constant circulation of susceptible strains of these pathogens. *Conclusions.* Prospective epidemiological surveillance and microbiological monitoring are required in the BMT units. Widespread contamination of household objects in the environment indicates the need to strengthen the hygienic education of patients and visitors as well as disinfection of these facilities. In addition, we recommend introduction of weekly fecal screening cultures to monitor intestinal colonization of patients with MDRO.

Key words: hospital-acquired infections, risk factors, vancomycin-resistant enterococci, prevalence, molecular typing, bone marrow transplantation.

Введение

В мире трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) ежегодно выполняют более чем 50 000 пациентам при более чем 70 заболеваниях [1]. Угнетение иммунной системы пациента при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток закономерно приводит к увеличению количества и тяжести инфекционных осложнений. Среди первичных и вторичных причин смерти больных злокачественными болезнями крови наиболее частой являются инфекционные осложнения — 37% случаев [2].

Также инфекционные осложнения, наряду с рецидивом гемобластоза, являются основной

причиной неудач трансплантации гемопоэтических клеток костного мозга или периферической крови. В течение нескольких месяцев после трансплантации реципиент переживает состояние, которое характеризуется глубокой миелосупрессией и иммунодефицитом.

Клиническая симптоматика чаще всего скудная, и распознать вовлечение органов в инфекционный процесс удастся не более чем у 30–40% пациентов; выделить микроорганизмы из крови или других диагностически значимых биосубстратов — еще реже: в 20–25% случаев.

Несмотря на то, что смертность, ассоциированная с инфекциями после аллогенной ТГСК, в последние два десятилетия была снижена,

проблема инфекционных осложнений остается актуальной, особенно в связи с ростом числа микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью [5].

Таким образом, присоединение инфекционных осложнений в процессе лечения гемобластозов может стать причиной гибели даже при отсутствии прогрессирующего роста опухоли. На фоне нейтропении риск развития инфекционных осложнений значительно возрастает, они приобретают атипичное, тяжелое и затяжное течение [7]. Единственным выходом из сложившейся ситуации является разработка обоснованных режимов антибактериальной профилактики и терапии, основанных на изучении этиологии, спектра антибиотикорезистентности возбудителей, а также факторов риска развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП).

Цель исследования: выявление эпидемиологических особенностей бактериальных инфекций у пациентов и циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов в отделениях трансплантации костного мозга.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе трех отделений трансплантации костного мозга Научно-исследовательского института гематологии, трансплантологии и онкологии имени Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика Павлова и на базе кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова МЗ РФ.

Исследование проводилось в несколько этапов разными методами эпидемиологического исследования.

Выявление эпидемиологических особенностей бактериальных инфекций. Изучение частоты, этиологии и факторов риска развития бактериальных инфекционных осложнений проводилось методом проспективного наблюдения с 01.04 по 31.08.14 г. Под наблюдением находился 91 пациент. О пациентах собирались следующие данные: возраст, диагноз, количество предыдущих госпитализаций, курсов полихимиотерапии, терапия в ходе текущей госпитализации, длительность применения инвазивных устройств, пребывание в отделении реанимации, исход, длительность цитопении, инфекционные осложнения и их этиология. Рутинное микробиологическое обследование пациентов проводилось по следующей схеме: посев мочи, кала, смыва со слизистой оболочки ротовой полости за 2 недели до трансплантации

костного мозга (ТМК), затем посев мочи, смыва со слизистой оболочки ротовой полости каждые 3 дня в период нейтропении. Микробиологические исследования других биосубстратов проводились по клиническим показаниям. Нейтропения определялась как снижение абсолютного числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов (ANC) в периферической крови до 1,5 тыс. в 1 мкл крови и ниже [8, 9]. Для диагностики сепсиса использовали критерии Европейского общества интенсивной терапии [10], Интернациональной организации «Сепсис-Форум» [11], согласительной конференции Российской ассоциации специалистов по хирургической инфекции [12]. Диагностика катетер-ассоциированной инфекции кровотока осуществлялась согласно классификации и критериям, разработанным Центром по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) [13, 14, 15]. Диагностика бактериальной пневмонии осуществлялась на основании критериев нозокомиальной и внебольничной пневмоний экспертов Российского респираторного общества (РРО), Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), Альянса клинических химиотерапевтов и микробиологов, Федерации анестезиологов и реаниматологов России (ФАР), Российской ассоциации специалистов по хирургическим инфекциям (РАСХИ) [16, 17, 18]. Диагностическими критериями для выявления инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) являлись лейкоцитурия и бактериурия (10 и более микробных тел в 1 мл мочи или более 10^5 колоний микроорганизмов одного вида, выросших при посеве 1 мл мочи, или 10^3 колоний микроорганизмов одного вида из 1 мл мочи, взятой мочевым катетером). Клинические признаки ИМВП могли варьировать от асимптоматической бактериурии до выраженной интоксикации, дизурии и анурии.

Для изучения колонизации проводился микробиологический мониторинг пациентов при поступлении в отделение, а далее каждую неделю до выписки из отделения. Исследованию подлежали смывы с кожи и слизистой оболочки ротовой полости, кал. Всего выполнено 639 исследований материала, полученного от 50 пациентов.

Выявление циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов. Изучение циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов проводилось методом исследований точечной превалентности. Трижды в течение 3 месяцев через равные промежутки времени проводились бактериологические исследования смывов со слизистой оболочки ротовой полости, кожи, посева мочи, кала пациентов, а также смывов с объектов внешней среды. Еще

2 исследования были проведены через 3 и 6 месяцев. Всего были обследованы 59 пациентов (162 исследования), проведено 170 исследований объектов внешней среды.

Определение антибиотикорезистентности проводилось диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями NCCLS [19] на агаре Мюллера–Хинтон и методом серийных разведений на анализаторе «ВИТЕК-2».

Верификация устойчивости энтерококков к ванкомицину осуществлялась амплификацией касет ванкомицин-резистентности *vanA* и *vanB* согласно методике, предложенной Dutka-Malen S. et al. [20]. Молекулярно-генетическое типирование энтерококков методом ПЦР со «случайными» праймерами (RAPD-ПЦР) проводилось с применением универсального праймера R5 (5'-AACGCGCAAC-3') в концентрации 50 пмоль/мкл согласно условиям реакции, предложенным Martin B. с соавт. [21]. VNTR-анализ проводился с использованием методики, предложенной J. Top с соавт. [22].

Молекулярно-генетическое типирование грамотрицательных бактерий методом RAPD-ПЦР с применением праймера M13 [23].

Реакции проводились на амплификаторах CFX96 (Bio-Rad, США) и «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Mastercycler (Eppendorf AG, Германия)

Таблица 1. Причина смерти и этиология инфекционных осложнений

Table 1. Etiology of infection mortality

Причина смерти/этиология Etiology of mortality	абс. abs.	%
Неинфекционная Noncontagious disease	9	30,0
Аспергиллез легких Pulmonary aspergillosis	1	3,3
Инфекция легких неуточненной этиологии Not otherwise specified lung infection	6	20,0
Пневмония/К. pneumoniae Pneumonia/ <i>K. pneumoniae</i>	3	10,0
Пневмония/К. pneumoniae, P. aeruginosa Pneumonia/ <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	1	3,3
Пневмония/P. aeruginosa Pneumonia/ <i>P. aeruginosa</i>	1	3,3
Пневмония-сепсис/К. pneumoniae Pneumonia-sepsis/ <i>K. pneumoniae</i>	5	16,7
Пневмония-сепсис/P. aeruginosa Pneumonia-sepsis/ <i>P. aeruginosa</i>	2	6,7
Сепсис/К. pneumoniae Sepsis/ <i>K. pneumoniae</i>	1	3,3
Сепсис/P. aeruginosa Sepsis/ <i>P. aeruginosa</i>	1	3,3
Общий итог Total	30	100,0

Результаты

Выявление эпидемиологических особенностей бактериальных инфекций

За период проспективного наблюдения было выявлено 100 случаев бактериальных инфекционных осложнений у 57 пациентов: сепсис — 30,8, пневмония — 26,4, инфекции мочевыводящих путей — 32,9, инфекции мягких тканей — 9,9, катетер-ассоциированная инфекция кровотока — 9,9 на 100 пациентов.

В 70 (71,4%) случаях инфекционные осложнения были обусловлены грамотрицательными микроорганизмами. Наиболее часто они вызывали пневмонию — в 91,7% случаев, сепсис был вызван данными микроорганизмами в 64,3% случаев, инфекции мочевыводящих путей — 76,7%, инфекции мягких тканей — в 85,7%. В 20% случаев инфекции были вызваны ассоциациями микроорганизмов.

Летальность составила 32,97%, при этом в 70% случаев причиной смерти была инфекционная патология, в этиологической структуре которой *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* были выявлены в 66,7% случаев (табл. 1). Летальность от инфекционных осложнений, вызванных данными микроорганизмами, составила 24,6%.

Пневмония увеличивала риск летального исхода в 10,2 раза [95% ДИ 3,81–27,1] $p < 0,01$, сепсис — в 2,3 раза [95% ДИ 1,29–4,28], $p = 0,005$.

Сепсис и пневмония возникали чаще на фоне цитопении (RR 2,63 [95% ДИ 1,52–4,57] $p = 0,004$ и RR 3,97 [95% ДИ 2,19–7,19] $p < 0,001$ соответственно). Медиана длительности цитопении до возникновения сепсиса составила 18 дней, а пневмонии — 1 день, 45,8% пневмоний были диагностированы в первые сутки цитопении. Для других факторов для развития сепсиса статистически значимых различий выявлено не было.

Факторами риска развития пневмонии явились пятая и более госпитализация (RR 1,99 [95% ДИ 1,03–3,87], $p = 0,049$), шестой и более курс полихимиотерапии (RR 2,98 [95% ДИ 1,22–7,25] $p = 0,008$), аллогенная ТКМ (RR 2,46 [95% ДИ 1,08–5,62] $p = 0,022$).

Изучение колонизации пациентов показало, что в 60% случаев инфекционные осложнения возникали на фоне предшествующей колонизации пациента данным микроорганизмом. Инфекция развилась у 35,3% колонизированных пациентов, тогда как при невыявленной колонизации только у 12,1% (RR 2,91 [95% ДИ 0,95–8,94] $p = 0,047$). Частота и соотношение колонизации и клинически выраженных форм инфекций варьировали для различных микроорганизмов.

Так около 50% пациентов развивали клинически выраженных формы инфекций при

Таблица 2. Характеристика генотипов *E. faecium* по результатам MLVA типированияTable 2. Characteristics of *E. faecium* genotypes according to serotyping

№ штамма No. strains of microorganisms	Стационар Hospital	Год Year	VRE <i>vanA</i>	RAPD тип-I RAPD type-I	VNTR
170	Gem	2014	+	+	5-9-3-3-1-2
50	Gem	2013	+	+	5-9-3-3-1-2
6-1	Gem	2013	+	+	5-9-3-3-1-2
32	Gem	2013	+	+	5-9-3-3-1-2
37	Gem	2013	+	+	5-9-3-3-2-3
209	Gem	2014	+	+	5-9-3-3-2-3
116	Gem	2014	+	+	5-9-3-3-2-3
667	Gem	2014	+	+	5-9-3-3-2-3
676	Gem	2014	+	+	5-9-3-3-2-3

инфицировании *K. pneumoniae* и *A.baumannii*, тогда как 75% при инфицировании *P. aeruginosa* и только 16,7% — *Enterobacter* sp.

Микроорганизмы с множественной антибиотикорезистентностью (ММАР) были выделены от 53,1% пациентов, из них *K. pneumoniae*, резистентная к карбапенему — от 22,5% пациентов, *E. faecium*, резистентный к ванкомицину — 18,4% пациентов, *P. aeruginosa*, резистентная к карбапенему, — от 12,2% пациентов.

В динамике частота колонизации пациентов чувствительными к антибиотикам микроорганизмами снижалась, а резистентными — увеличивалась (рис.).

При поступлении и в первую неделю госпитализации в отделение ММАР от пациентов выделено не было. Впервые колонизация пациентов ММАР появляется на 2 неделе госпитализации, резко увеличиваясь на 3 неделе и продолжая оставаться на высоком уровне весь дальнейший период госпитализации.

Следует отметить, что все выделенные штаммы *P. aeruginosa* были резистентны к карбапенему. Только в одном случае пациент был колонизирован и чувствительными, и резистентными к карбапенему штаммами *K. pneumoniae*, во всех остальных случаях наблюдалась колонизация или только чувствительными, или толь-

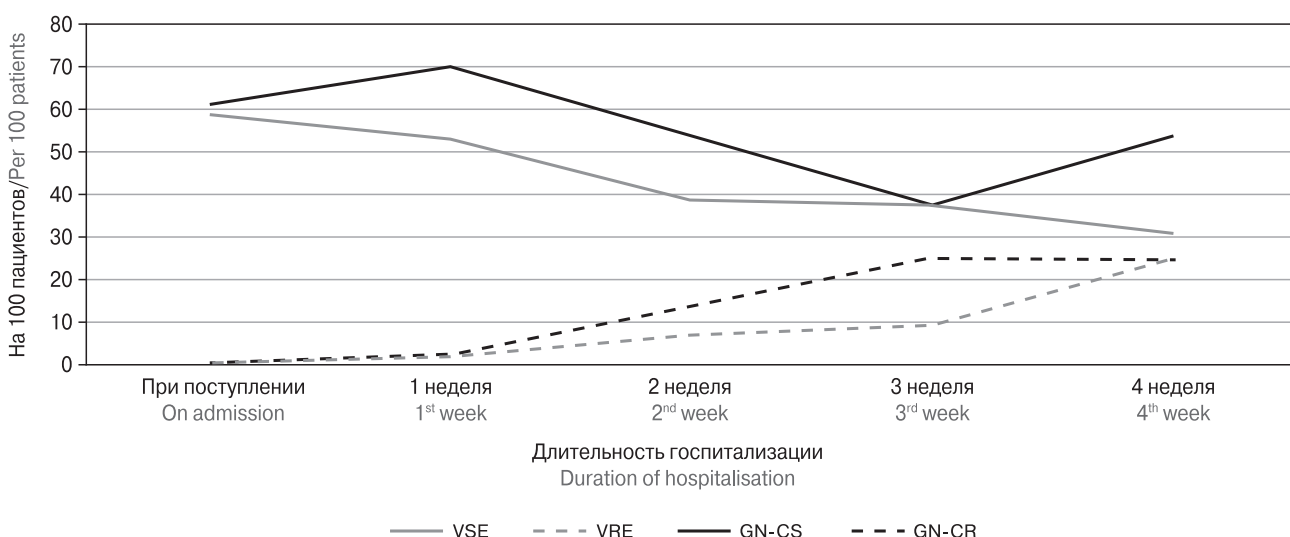


Рисунок. Динамика частоты колонизации/инфекции пациентов в период пребывания в отделении онкогематологии

Figure. Curve of patients colonization/infection rate during hospitalisation at the oncohematology units

VSE — ванкомицин-чувствительный *E. faecium*; VRE — ванкомицин-резистентный *E. faecium*; Гр-CS — карбапенем-чувствительные Гр⁻ микроорганизмы; Гр-CR — карбапенем-резистентные Гр⁻ микроорганизмы.

VSE — vancomycin-sensitive *E. faecium*; VRE — vancomycin-resistant *E. faecium*; Gram-negative-CS — carbapenem-sensitive Gr⁻ microorganisms; Gram-negative-CR — carbapenem-resistant Gr⁻ microorganisms.

ко резистентными к карбапенему штаммами. *E. faecium*, резистентный к ванкомицину, в течение госпитализации замещал *E. faecium*, чувствительного к ванкомицину: в первую неделю госпитализации от пациентов были выделены чувствительные к ванкомицину штаммы, в последующем — устойчивые штаммы.

Наиболее часто ММАР обнаруживались в кале пациентов. Исключение составляла *P. aeruginosa*, которая в 100% случаев была выделена со слизистой оболочки ротовой полости, что свидетельствует о преимущественно экзогенном инфицировании пациентов.

При проведении RAPD-ПЦР для молекулярно-генетического типирования изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в ходе проведения проспективного наблюдения, удалось выявить 2 RAPD типа из 14 протипированных штаммов, резистентных к карбапенемам. RAPD-тип I включал 4 изолята, RAPD-тип II включал 2 изолята *K. pneumoniae*. Все остальные штаммы *K. pneumoniae* не имели сходных паттернов типирования. При типировании штаммов *Enterobacter* spp. было выявлено, что 4 из 5 изолятов имели схожие паттерны типирования, и относились к одному RAPD-типу, что позволяет говорить в пользу госпитального происхождения данного штамма.

Молекулярно-генетическое типирование энтерококков, фенотипически устойчивых к ванкомицину, показало, что 11 из 13 штаммов могли быть отнесены к одному профилю RAPD-типа. Устойчивость к ванкомицину у штаммов данного RAPD-типа была обусловлена наличием кассеты ванкомицинрезистентности *vanA*. Для верификации результатов RAPD-генотипирования, культуры доминировавшего в стационаре RAPD-типа были дополнительно протипированы методом VNTR. В результате VNTR типирования выделено 2 основных MLVA типа (MTs)–MT-1 (5:9:3:3:1:2) и MT-2 (5:9:3:3:2:3), которые циркулируют в данном стационаре длительное время (табл. 2).

Выявление циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов

При изучении циркуляции эпидемиологически значимых микроорганизмов методом исследования точечной превалентности было установлено, что среди грамотрицательных микроорганизмов преобладали *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp. Грамположительные микроорганизмы были представлены в большинстве случаев *S. epidermidis*, *E. faecium*, *E. faecalis*. Выявлена контаминация объектов внешней среды такими эпидемиологически значимыми микроорганизмами, как *K. pneumoniae*, ванкомицин-резистентные *E. faecium*. Множественная устойчивость к антибиотикам была обнаружена у *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*.

В разные этапы исследования частота выделения ММАР была неодинаковой.

В большинстве исследований точечной превалентности от пациентов и из смывов с объектов внешней среды был выделен VRE. Удельный вес колонизированных VRE пациентов от всех колонизированных *E. faecium* колебался от 0 до 66,7%. Факторами передачи чаще всего служили объекты внешней среды бытового назначения — столы в палатах, микроволновая печь, холодильники. Следует отметить, что в исследовании № 2 VRE был обнаружен в палате на столе при отсутствии колонизированных пациентов в отделении, что может косвенно свидетельствовать о возможности длительного выживания VRE на объектах внешней среды.

Несмотря на то, что колонизация *Enterobacter* sp. наблюдалась на протяжении первых четырех исследований, *Enterobacter* sp., устойчивый к карбапенемам (ECLCR), был обнаружен только в исследовании № 4 и доля пациентов, колонизированных им, от всех колонизированных *Enterobacter* sp. составила 24,8%. Аналогичная ситуация наблюдалась и с колонизацией *K. pneumoniae*. Колонизация пациентов данным микроорганизмом была выявлена в 3 из 5 исследований. Однако колонизация *K. pneumoniae*, резистентной к карбапенемам (KPNCr), была выявлена лишь в исследовании № 5, доля пациентов, колонизированных им, от всех колонизированных *K. pneumoniae* составила 24,6%. При этом до этого, в исследовании № 3, KPNCr была выделена с клавиатуры компьютера на посту медицинской сестры. Колонизация пациента и контаминация объектов внешней среды *P. aeruginosa* были выявлены только в одном из исследований.

Молекулярно-генетическое типирование методом RAPD-ПЦР для мультирезистентных изолятов *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp. не позволило выявить сходных паттернов типирования. В то же время установлено, что 17 из 20 штаммов энтерококков, фенотипически устойчивых к ванкомицину, были отнесены к одному профилю RAPD-генотипирования. Устойчивость к ванкомицину у штаммов данного RAPD-типа была обусловлена наличием кассеты ванкомицинрезистентности *vanA*.

Таким образом, результаты превалентного исследования показали постоянную циркуляцию VRE в отделении с передачей от пациента к пациенту контактно-бытовым путем через объекты внешней среды бытового назначения. Мультирезистентные грамотрицательные микроорганизмы не имели постоянной циркуляции и появлялись периодически на фоне циркуляции чувствительных штаммов этих возбудителей.

Обсуждение

Выявлена высокая частота инфекционных осложнений у пациентов отделений трансплантации костного мозга. Большинство инфекций были вызваны грамотрицательными микроорганизмами, лидирующее положение среди которых занимает *K. pneumoniae*. Летальные исходы наблюдались от сепсиса и пневмонии, вызванных *K. pneumoniae* и/или *P. aeruginosa*. В большинстве случаев началу клинических проявлений предшествовала колонизация пациента данным микроорганизмом. Колонизация пациента и цитопения являются статистически значимыми факторами риска сепсиса и пневмонии.

Была выявлена высокая частота колонизации пациентов ММАР. В проспективном наблюдении наиболее часто обнаруживалась колонизация *K. pneumoniae*, резистентной к карбапенему. Именно данный микроорганизм также наиболее часто вызывал клинически выраженные формы инфекции, в том числе с летальным исходом. В исследовании, проведенном в Италии, также была установлена высокая частота колонизации пациентов *K. pneumoniae*, резистентной к карбапенему, о которой сообщили 53,4% гематологических центров. Причем инцидентность инфекций, вызванных данным микроорганизмом, возросла с 0,1% в 2010 до 0,7% в 2013 г. у пациентов с аутоотрансплантацией и с 0,4 до 2,9% у пациентов с аллотрансплантацией стволовых клеток костного мозга. Частота колонизации составила 25,8% и 39,2% соответственно. Выявление носителей и раннее определение стратегии терапии авторы выделяют как ключевые меры помощи таким пациентам [24]. Серией превалянтных исследований было выявлено, что *K. pneumoniae*, резистентная к карбапенему, циркулирует в отделении не постоянно. Вторым по частоте колонизации был *E. faecium*, резистентный к ванкомицину. Несмотря на то, что многие исследования показывают, что колонизация данным микроорганизмом является фактором риска развития инфекций кровотока [5], в нашем исследовании случаев инфекции выявлено не было. Частота колонизации VRE варьирует в различных исследованиях 7,8% [25], 10,1% [26], 24,6% [27]. Серия превалянтных исследований также показала значительную вариабельность частоты колонизации (от 0 до 40%) в различные периоды исследования. Однако в исследовании, в котором не было выявлено колонизированных пациентов, VRE был обнаружен на объектах внешней среды. Молекулярно-генетическое типирование показало, что большая часть штаммов могла быть отнесена к одному профилю RAPD-генотипирования.

Устойчивость к ванкомицину у штаммов данного RAPD-типа была, обусловлена наличием генной кассеты ванкомицинрезистентности *vanA*. В результате VNTR типирования выделено 2 основных MLVA типа VRE, один из них эндемический, другой — эпидемический. Это доказывает постоянную циркуляцию VRE в отделении. Результаты исследования объектов внешней среды показали, что циркуляция VRE поддерживается посредством контактно-бытовой передачи. Косвенно это подтверждается исследованиями, проведенными в Канаде, в которых было выявлено, что пациенты выполняли гигиену рук в 29,7% после посещения туалета, в 39,1% перед едой, в 3,3% перед посещением кухни, в 2,9% перед входом в палату и в 6,7% перед выходом из палаты. Это свидетельствует о возможности передачи инфекций от объектов внешней среды больницы путем непрямого контакта [28]. *P. aeruginosa* является одним из значимых микроорганизмов, вызывающих манифестные формы инфекций с высокой летальностью, а также вспышки инфекций в отделениях трансплантации костного мозга [5]. Если в серии превалянтных исследований от пациентов и с объектов внешней среды была выделена *P. aeruginosa*, чувствительная к карбапенему, то при проспективном наблюдении установлена циркуляция штамма *P. aeruginosa*, устойчивого к карбапенему. Обнаружение *E. cloacae*, резистентного к карбапенему, в одном из превалянтных исследований свидетельствует о том, что любой вид из семейства *Enterobacteriaceae* может приобрести антибиотикорезистентность в процессе циркуляции в отделении. Отсутствие колонизации ММАР при поступлении в отделение свидетельствует о формировании резистентности под влиянием лечебно-диагностического процесса и о передаче ММАР между пациентами.

Для своевременного проведения мер инфекционного контроля, таких как контактная изоляция [5], в отношении пациентов, колонизированных ММАР, и выбора соответствующей терапии, необходимо обследование пациентов на носительство ММАР. Наше исследование показало, что ведущим резервуаром эпидемиологически и клинически значимых штаммов является кишечник пациентов, а колонизация является значимым фактором риска возникновения клинически выраженных форм инфекций. Это диктует необходимость еженедельного обследования на носительство данных микроорганизмов в кишечнике пациентов. Широкая контаминация объектов внешней среды показывает необходимость совершенствования гигиенического обучения персонала и посетителей, а также дезинфекции данных объектов.

Выводы

Высокая частота инфекционных осложнений, вызванных широким спектром микроорганизмов с различным профилем антибиотикорезистентности, в том числе со множе-

ственной, требует внедрения проспективного эпидемиологического наблюдения и микробиологического мониторинга в отделениях ТКМ для своевременного принятия противоэпидемических мер и выбора рациональной терапии.

Список литературы/References

1. Войцеховский В.В. Анализ инфекционных осложнений гемобластозов в Амурской области // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012. № 46. С. 64–68. [Wojciechowski V.V. Analysis infectious complications of hemoblastoses in the Amur region. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya* = *Bulletin of the Physiology and Pathology Breathing*, 2012, no. 46, pp. 64–68. (In Russ.)]
2. Галстян Г.М., Макарова П.М., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Клясова Г.А., Покровская О.С., Дроков М.Ю., Новиков В.А., Троицкая В.В., Костина И.Э., Савченко В.Г. Успешная трансплантация аллогенного костного мозга у больных с тяжелым грамотрицательным сепсисом и септическим шоком // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2014. Т. 7, № 2. С. 122–130. [Galstyan G.M., Makarova P.M., Kuz'mina L.A., Parovichnikova E.N., Klyasova G.A., Pokrovskaya O.S., Drovkov M.Yu., Novikov V.A., Troitskaya V.V., Kostina I.E., Savchenko V.G. Successful allogeneic bone marrow transplantation in patients with severe gram-negative sepsis and septic shock. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika* = *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*, 2014, vol. 7, no. 2, pp. 122–130. (In Russ.)]
3. Гельфанд Б.Р., Белоцерковский Б.З., Проценко Д.Н., Яковлев С.В., Еремин С.Р., Руднов В.А., Белобородов В.Б., Сидоренко С.В., Ефименко Н.А., Романовский Ю.Я. Нозокомиальная пневмония в хирургии (Методические рекомендации) // Инфекции и антимикробная терапия. 2003. Т. 5, № 6. С. 124–129. [Gelfand B.R., Belotserkovsky B.Z., Protsenko D.N., Yakovlev S.V., Eremin S.R., Rudnov V.A., Beloborodov V.B., Sidorenko S.V., Efimenko N.A., Romanovsky Yu.Ya. Nosocomial pneumonia in surgery (Guidelines). *Infektsii i antimikrobnaya terapiya* = *Infections and Antimicrobial Therapy*, 2003, no. 5–6, pp. 124–129. (In Russ.)]
4. Клясова Г.А., Капорская Т.С., Сперанская Л.Л., Поспелова Т.И., Миронова А.В., Масчан М.А., Верещагина С.А., Крайнова Л.Е., Трушина Е.Е., Фролова И.Н., Юрицина Н.Ю. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования) // Гематология и трансфузиология. 2007. № 1. С. 11–19. [Klyasova G.A., Kaporskaya T.S., Speranskaya L.L., Pospelova T.I., Mironova A.V., Maschan M.A., Vereshchagina S.A., Krainova L.E., Trushina E.E., Frolova I.N., Yuricina N.Yu. The causative agents of sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance (results of a multicenter study). *Gematologiya i transfuziologiya* = *Hematology and Blood Transfusion*, 2007, no. 1, pp. 11–19 (In Russ.)]
5. Птушкин В.В., Волкова М.А. Современные возможности лечения фебрильной нейтропении // Русский медицинский журнал. 1998. № 22. С. 1439–1446. [Ptushkin V.V., Volkova M.A. Current treatment options of febrile neutropenia. *Russkii meditsinskii zhurnal* = *Russian Medical Journal*, 1998, no. 22, pp. 1439–1446 (In Russ.)]
6. Сепсис в начале XXI века. Классификация. Клинико-диагностическая концепция и лечение. Патолого-анатомическая диагностика: практическое руководство. Под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда. М.: Литтерра, 2006. 176 с. [Sepsis v nachale XXI veka. Klassifikatsiya. Kliniko-diagnosticheskaya kontseptsiya i lechenie. Patologo-anatomicheskaya diagnostika: prakticheskoe rukovodstvo. Pod red. V.S. Savel'eva, B.R. Gel'fanda [Sepsis in the beginning of the XXI century. Classification. Clinical and diagnostic concept and treatment. Post-mortem diagnosis. A practical guide. Eds. Savel'yev V.S., Gelfand B.R.]. *Moscow: Litterra*, 2006. 176 p.
7. Сидоренко С.В. Инфекции, связанные с центральным венозным катетером // Инфекции и антимикробная терапия. 2001. № 2. С. 24–35. [Sidorenko S.V. Infections associated with central venous catheter. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya* = *Infections and Antimicrobial Therapy*, 2001, no. 2, pp. 24–35. (In Russ.)]
8. Соломенный А.И., Максимов А.Ю., Саралов А.И., Яфаев Р.Х., Гончаров А.Е., Керопиан Е.А., Мултых И.Г. Появление интегрон-позитивного полирезистентного штамма *Acinetobacter baumannii* в российских стационарах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. № 4. С. 89–91. [Solomennyy A.P., Maksimov A.Yu., Saralov A.I., Yafayev R.Kh., Goncharov A.E., Keropian E.A., Mulytsh I.G. The appearance of integron-positive strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Russian hospitals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2008, no. 4, pp. 89–91. (In Russ.)]
9. Чучалин А.Г., Генфальд Б.Р. Нозокомиальная пневмония взрослых (Национальные рекомендации) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009. Т. 11, № 2. С. 100–142. [Chuchalin A.G., Genfald B.R. Nosocomial pneumonia of adults (National guidelines). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, vol. 11, no. 2, pp. 100–142. (In Russ.)]
10. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Нозокомиальная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Пособие для врачей // Пульмонология. 2005. № 3. С. 13–36. [Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Kozlov R.S., Tyurin I.E., Rachina S.A. Nosocomial pneumonia in adults: practical recommendations for diagnosis, treatment and prevention. A guide for physicians. *Pul'monologiya* = *Pulmonology*, 2005, no. 3, pp. 13–36. (In Russ.)]
11. Bass P., Karki S., Rhodes D., Gonelli S., Land G., Watson K., Spelman D., Harrington G., Kennon J., Cheng A.C. Impact of chlorhexidine-impregnated washcloths on reducing incidence of vancomycin-resistant enterococci colonization in hematology-oncology patients. *Am. J. Infect. Control*, 2013, vol. 41, no. 4, pp. 345–348. doi: 10.1016/j.ajic

12. Dykewicz C. A., Harold W. J., Kaplan J.E. CDC Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2000, no. 6, pp. 659–734. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.06.019
13. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 1, pp. 24–27.
14. Girmenia C., Rossolini G.M., Piciocchi A., Bertaina A., Pisapia G., Pastore D., Sica S., Severino A., Cudillo L., Ciceri F., Scimè R., Lombardini L., Viscoli C., Rambaldi A.; Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). Infections by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in SCT recipients: a nationwide retrospective survey from Italy. *Bone Marrow Transplant.*, 2015, vol. 50, no. 2, pp. 282–288. doi: 10.1038/bmt.2014.231
15. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G. International sepsis definitions conference. *Crit. Care Med.*, 2003, vol. 31, no. 4, pp. 1250–1256. doi: 10.1007/s00134-003-1662-x
16. Mermel L.A., Farr B.M., Sherertz R.J., Raad I.I., O'Grady N., Harris J.S., Craven D.E.; Infectious Diseases Society of America; American College of Critical Care Medicine; Society for Healthcare Epidemiology of America. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, vol. 32, no. 9, pp. 1249–1272. doi: 10.1086/320001
17. Mikulska M., Del Bono V., Viscoli C. Bacterial infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Curr. Opin. Hematol.*, 2014, vol. 21, no. 6, pp. 451–458. doi: 10.4084/MJHID.2015.045
18. Martin B., Garriga M., Hugas M., Aymerich T. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, vol. 98, no. 5, pp. 1177–1190. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02555.x
19. Ruhnke M., Arnold R., Gastmeier P. Infection control issues in patients with haematological malignancies in the era of multidrug-resistant bacteria. *Lancet Oncol.*, 2014, vol. 15, no. 13, pp. 606–619. doi: http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(14)70344-4
20. Seifert H., Jansen B., Widmer A.F., Farr B.M. Central-venous catheters // Catheter-related infections. Eds. Seifert H., Jansen B., Farr B.M. 2nd ed. *New York: Marcel Dekker*, 2004, pp. 293–315. doi: 10.1007/s00134-003-2045-z
21. Srigley J.A., Furness C.D., Gardam M. Measurement of patient hand hygiene in multiorgan transplant units using a novel technology: an observational study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2014, vol. 35, no. 11, pp. 1336–1341. doi: 10.1086/678419
22. Top J., Schouls L.M., Bonten M.J.M., Willems R.J.L. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 10, pp. 4503–4511. doi: 10.1128/jcm.42.10.4503-4511.2004
23. Tsiatis A.C., Manes B., Calder C., Billheimer D., Wilkerson K.S., Frangoul H. Incidence and clinical complications of vancomycin-resistant enterococcus in pediatric stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant.*, 2004, vol. 33, no. 9, pp. 937–941. doi: 10.1038/sj.bmt.1704462
24. Vincent J.L., de Backer D.; SCCM. International Sepsis Forum. The International Sepsis Forum's controversies in sepsis: my initial vasopressor agent in septic shock is dopamine rather than norepinephrine. *Crit. Care*, 2003, vol. 7, no. 1, pp. 6–8. doi: 10.1186/cc1851
25. Zirakzadeh A., Gastineau D.A., Mandrekar J.N., Burke J.P., Johnston P.B., Patel R. Vancomycin-resistant enterococcal colonization appears associated with increased mortality among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, 2008, vol. 41, no. 4, pp. 385–392. doi: 10.1038/sj.bmt.170591

Авторы:

Любимова А.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Ряховских С.А., аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечников, Санкт-Петербург, Россия;

Шалыпина Н.А., аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Бродина Т.В., аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Аверьянова М.Ю., к.м.н., врач-гематолог Института детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Асланов Б.И., доцент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Нечаев В.В., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Lyubimova A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Ryakhovskikh S.A., PhD Candidate, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Shalyapina N.A., PhD Candidate, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Brodina T.V., PhD Candidate, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Averyanova M.Yu., PhD (Medicine), Hematologist, R.M. Gorbacheva Institute of Pediatric Hematology and Transplantation, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Aslanov B.I., Associate Professor, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Nechaev V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила в редакцию 08.03.2017
Отправлена на доработку 08.08.2017
Принята к печати 22.08.2017

Received 08.03.2017
Revision received 08.08.2017
Accepted 22.08.2017

ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ В СТРУКТУРЕ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ И ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, В МОСКВЕ И В РОССИИ

Н.И. Брико¹, П.Д. Лопухов¹, А.Д. Каприн², Е.Г. Новикова², О.И. Трушина²,
А.А. Халдин³, О.В. Жукова³, Д.Р. Исаева³, А.И. Скворцова³

¹ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, Москва, Россия

³ ГБУЗ Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

Резюме. К группе онкогинекологических заболеваний относятся злокачественные новообразования тела матки, яичников, шейки матки, вульвы и влагалища (в возникновении трех последних установлена ведущая роль ВПЧ). Среди обширной группы инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), официальной регистрации в России подлежат сифилис, гонорея, трихомоноз, хламидиоз, урогенитальный герпес и аногенитальные бородавки (АБ). Возникновение АБ в 95–100% случаев обусловлено ВПЧ 6 и 11 типов. Цель работы: определение места ВПЧ-ассоциированных заболеваний (рака шейки матки и АБ) в структуре онкогинекологической патологии и ИППП на протяжении последних лет на территории Москвы, сравнение с ситуацией по РФ в целом. **Материалы и методы.** Анализу подвергнуты регистры официальной регистрации заболеваемости и смертности от рака тела матки, яичников, шейки матки, вульвы и влагалища в целом по РФ и Москве за 2007–2015 гг., а также заболеваемости ИППП (включая сифилис, гонорею, трихомоноз, хламидиоз, урогенитальный герпес и АБ) по РФ и Москве за 2003–2015 гг. **Результаты.** За анализируемый период доля рака шейки матки (РШМ) в структуре заболеваемости онкогинекологическими новообразованиями населения Москвы составляла в среднем 23,7%, в структуре смертности от данных заболеваний — 24,1%; по РФ аналогичные показатели составили 29,8 и 28,3% соответственно. Доля АБ в структуре ИППП (для обоих полов) на территории Москвы выросла с 11,5% в 2003 г. до 25,7% в 2015 г. (максимум составлял 31,0% в 2014 г.). Наибольшая доля АБ среди ИППП отмечается в возрастных группах: 15–17 лет (до 59,8% в 2012 г.) и 18–29 лет (до 37,3% в 2014 г.). По РФ в 2015 г. на АБ приходилось 11,7% от всех ИППП (для обоих полов). **Заключение.** ВПЧ-ассоциированные заболевания (РШМ и АБ) занимают существенное место в структуре как онкогинекологических новообразований, так и ИППП. При этом в структуре ИППП по Москве АБ переместились с 5-го (в 2003 г.) на 1-е (в 2015 г.) ранговое место, обогнав сифилис, гонорею, трихомоноз и хламидиоз. Улучшение ситуации с онкогинекологическими заболеваниями и ИППП может быть достигнуто за счет эффективных мер профилактики ВПЧ-инфекции.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, рак шейки матки, аногенитальные бородавки, инфекции, передаваемые половым путем, заболеваемость, смертность.

Адрес для переписки:

Брико Николай Иванович
119991, Россия, Москва, ул. Большая Пироговская, 2-4,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет).
Тел.: 8 (499) 248-04-13 (служебн.). Факс: 8 (499) 248-69-70.
E-mail: nbrico@mail.ru

Contacts:

Nikolay I. Briko
119991, Russian Federation, Moscow, Bolshaya
Pirogovskaya str., 2–4, Sechenov University.
Phone: 8 (499) 248-04-13 (office). Fax: 8 (499) 248-69-70.
E-mail: nbrico@mail.ru

Библиографическое описание:

Брико Н.И., Лопухов П.Д., Каприн А.Д., Новикова Е.Г., Трушина О.И.,
Халдин А.А., Жукова О.В., Исаева Д.Р., Скворцова А.И.
ВПЧ-ассоциированные заболевания в структуре онкогинекологической
патологии и инфекций, передаваемых половым путем в Москве
и в России // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 359–366.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-359-366

Citation:

Briko N.I., Lopukhov P.D., Kaprin A.D., Novikova E.G., Trushina O.I.,
Khalidin A.A., Zhukova O.V., Isaeva D.R., Skvortsova A.I.
HPV-associated diseases in the structure of female reproductive
tract tumors and sexually transmitted infections in Moscow and
Russia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2017, vol. 7, no. 4, pp. 359–366. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-359-366

HPV-ASSOCIATED DISEASES IN THE STRUCTURE OF FEMALE REPRODUCTIVE TRACT TUMORS AND SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS IN MOSCOW AND RUSSIA

Briko N.I.^a, Lopukhov P.D., Kaprin A.D.^b, Novikova E.G.^b, Trushina O.I.^b, Khaldin A.A.^c, Zhukova O.V.^c, Isaeva D.R.^c, Skvortsova A.I.^c

^a Sechenov University, Moscow, Russian Federation

^b P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russian Federation

^c Moscow Research and Practical Center of Dermatology, Venereology and Cosmetology (MRPCDVC), Moscow, Russian Federation

Abstract. The group of female reproductive tract tumors includes cancers of corpus uteri, ovary, cervix, vulva and vagina (the last three are associated with HPV). Among the large group of sexually transmitted infections (STIs) there are only six infections, which subject to registration in the official statistical data in Russia: syphilis, gonorrhea, trichomoniasis, chlamydia, urogenital herpes and anogenital warts (AGWs). Occurrence of AGWs in 95–100% of cases caused by HPV types 6 and 11. Objectives: our aim was to determine the prevalence of HPV-associated diseases (cervical cancer and anogenital warts) in the structure of female reproductive tract tumors and STIs in recent years in Moscow, and to compare it with the prevalence in population of Russia. Methods: we analyzed retrospective data with diagnostic codes related to cancers of corpus uteri, ovary, cervix, vulva and vagina from the official statistic of cancer register using incidence and mortality rates between January 2007 and December 2015 in Russia and Moscow. We also analyzed retrospective data of STIs (incl. syphilis, gonorrhea, trichomoniasis, chlamydia, urogenital herpes and AGWs) incidence rates between January 2003 and December 2015. Results: average rate of cervical cancer incidence among the female reproductive tract tumors accounted for 23.7% in Moscow (29.8% in Russia). Average rate of cervical cancer mortality among the female reproductive tract tumors accounted for 24.1% in Moscow (28.3% in Russia). The rate of AGWs in the STIs structure (for both sexes) in Moscow increased from 11.5% in 2003 to 25.7% in 2015 (the maximum was 31.0% in 2014). The highest rate of AGWs was detected in the age group 15–17 years (up to 59.8% in 2012), followed by 18–29 years (up to 37.3% in 2014). The rate of AGWs was 11.7% among all STIs (in both sexes) in Russia in 2015. Conclusion: HPV-associated diseases (cervical cancer and AGWs) take up a significant place in the structure of female reproductive tract tumors and STIs. And in the structure of the STI for Moscow, AGWs moved from the 5th (in 2003) to the 1st (in 2015) ranked place, surpassing syphilis, gonorrhea, trichomoniasis and chlamydia. The effective prevention of HPV-infection would be able to improve the situation.

Key words: HPV, cervical cancer, anogenital warts, sexually transmitted infections, incidence, mortality.

Введение

Инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) связывают с развитием рака шейки матки, полового члена, вульвы, влагалища, анального канала, головы и шеи [17, 18]. Помимо злокачественных новообразований генитальная ВПЧ-инфекция является этиологическим агентом при возникновении аногенитальных бородавок (АБ) и папилломатоза гортани, которые достоверно связаны с 6 и 11 типами ВПЧ [10, 11].

К группе онкогинекологических заболеваний относятся злокачественные новообразования тела матки, яичников, шейки матки, вульвы и влагалища (в возникновении трех последних установлена ведущая роль ВПЧ). Роль инфицирования женщин ВПЧ в возникновении рака шейки матки (РШМ) была доказана в ряде эпидемиологических и молекулярно-генетических исследований. ДНК ВПЧ различных типов была обнаружена в 99,7% случаев плоскоклеточного рака и аденокарциномы [14–16]. При раке и предраковых поражениях влагалища ДНК ВПЧ обнаруживается в большинстве случаев. Согласно последним данным, от 64 до 91% случаев вагинального рака и от 82 до 100% вагинальной интраэпителиальной неоплазии 3 степени (VaIN 3) являются положительными на ДНК ВПЧ. Порядка 40–50% случаев рака вульвы также ассоциированы с ВПЧ [10, 12, 13].

Анализ заболеваемости является неотъемлемой частью эпидемиологического надзора и играет важную роль в планировании и усовершенствовании мер по профилактике как инфекционных, так и неинфекционных болезней. В 2012 г. в мире зарегистрировано 528 000 новых случаев РШМ (четвертый по частоте встречаемости вид рака среди женщин) и 266 000 смертей от этого заболевания (также четвертое место среди злокачественных новообразований, повлекших за собой смерть). Показатель заболеваемости РШМ сильно варьирует в разных странах и зависит от уровня развития экономики и здравоохранения. Так, РШМ является наиболее распространенным видом рака в 38 из 184 стран мира и в 45 странах — ведущей причиной смерти. Это страны Африки (к югу от Сахары), Азии, а также Центральной и Южной Америки. Наименьшие показатели заболеваемости отмечаются в Западной Европе, Северной Америке, Австралии, Новой Зеландии и странах Восточного Средиземноморья. За последние 30 лет во многих странах заболеваемость РШМ снизилась, что связано с повышением уровня жизни населения, а в некоторых странах — с внедрением эффективной системы вторичной профилактики. В то же время в ряде стран Восточной Европы и бывшего СССР отмечается рост заболеваемости РШМ [19].

Среди обширной группы инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), официальной

регистрации в России подлежат сифилис, гонорея, трихомоноз, хламидиоз, урогенитальный герпес и аногенитальные бородавки (АБ).

Целью данной работы является определение места ВПЧ-ассоциированных заболеваний (РШМ и АБ) в структуре онкогинекологической патологии и ИППП на протяжении последних лет на территории Москвы в сравнении с ситуацией по Российской Федерации (РФ) в целом.

Материалы и методы

Злокачественные новообразования. В работе использованы данные, приведенные в ежегодных сборниках «Злокачественные новообразования в России» [1–9], в которых приводится анализ данных государственной медицинской статистики по форме № 7 «Сведения о заболеваниях злокачественными новообразованиями», а также используются данные Росстата о распределении умерших от злокачественных новообразований по полу и возрасту (форма № 5) и среднегодовой численности населения административных территорий России за рассматриваемые года.

Также в работе использовали данные по заболеваемости и смертности от рака вульвы (С51, МКБ-10), влагалища (С52, МКБ-10), шейки матки (С53, МКБ-10), тела матки (С54, МКБ-10), яичников (С56, МКБ-10) в Москве и в РФ за период с января 2007 г. по декабрь 2015 г.

Для расчета стандартизованных показателей заболеваемости и смертности использован мировой стандарт возрастного распределения населения.

Аногентиальные (венерические) бородавки. Для анализа заболеваемости аногентиальными (венерическими) бородавками (А63.0, МКБ-10) в Российской Федерации и в Москве использовались данные Государственной медицинской статистики из формы № 9 «Сведения о заболевании инфекциями, передаваемыми половым путем, и заразными кожными болезнями», в которую помимо аногентиальных (венерических) бородавок из группы инфекций, передаваемых половым путем, также включены: сифилис (А50-А53, МКБ-10), гонорея (А54.0-А54.9, МКБ-10), трихомоноз (А59.0, А59.8, А59.9, МКБ-10), хламидиоз (А56.0-А56.4, А56.8, МКБ-10), урогенитальный герпес (А60.0, А60.1, А60.9, МКБ-10). Используются среднегодовые данные о численности населения Москвы и России за анализируемый период. Показатели стандартизованы по полу и возрасту.

Результаты

Уровни заболеваемости раком

Рак шейки матки. Всего с 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 7821 новых случаев РШМ, за год в среднем регистрировалось 869

случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 134 448 новых случаев РШМ (в среднем 14 939 в год).

Стандартизованные показатели заболеваемости РШМ в Москве с 2007 по 2015 гг. составляли от 8,0 до 10,3 на 100 000 женского населения, в среднем 9,2 случая на 100 000. По РФ в целом стандартизованные показатели варьировались от 12,5 до 15,0 на 100 000 женщин, в среднем 13,7 на 100 000 (рис. 1А).

Рак тела матки. С 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 15 474 новых случаев рака тела матки, за год в среднем регистрировалось 1719 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 188 827 новых случаев рака тела матки (в среднем 20 981 в год).

Стандартизованные показатели заболеваемости раком тела матки в Москве с 2007 по 2015 гг. составляли от 14,2 до 16,6 на 100 000 женского населения, в среднем 15,7 случая на 100 000. По РФ в целом стандартизованные показатели варьировались от 14,8 до 17,6 на 100 000 женщин, в среднем 16,1 на 100 000 (рис. 1Б).

Рак вульвы. До 2011 г. в России рак вульвы статистическому учету не подлежал. С 2011 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 726 новых случаев рака вульвы, за год в среднем регистрировалось 145 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 9129 новых случаев рака вульвы (в среднем 1826 в год).

Стандартизованные показатели заболеваемости раком вульвы в Москве с 2011 по 2015 гг. составляли от 0,88 до 1,02 на 100 000 женского населения, в среднем 0,94 случая на 100 000. По РФ в целом стандартизованные показатели варьировались от 1,06 до 1,10 на 100 000 женщин, в среднем 1,07 на 100 000 (рис. 1В).

Рак влагалища. До 2011 г., как и рак вульвы, рак влагалища в России статистическому учету не подлежал. С 2011 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 138 новых случаев рака влагалища, за год в среднем регистрировалось 28 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 2195 новых случаев рака влагалища (в среднем 439 в год).

Стандартизованные показатели заболеваемости раком влагалища в Москве с 2011 по 2015 гг. составляли от 0,14 до 0,35 на 100 000 женского населения, в среднем 0,21 случая на 100 000. По РФ в целом стандартизованные показатели варьировались от 0,30 до 0,34 на 100 000 женщин, в среднем 0,31 на 100 000 (рис. 1Г).

Рак яичников. С 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 9415 новых случаев рака яичников, за год в среднем регистрировалось 1046 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 118 146 новых случаев рака яичников (в среднем 13 127 в год).

Стандартизованные показатели заболеваемости яичников в Москве с 2007 по 2015 гг. составляли от 8,2 до 11,7 на 100 000 женского населения, в среднем 9,9 случая на 100 000. По РФ в целом

стандартизированные показатели варьировались от 10,7 до 11,0 на 100 000 женщин, в среднем 10,8 на 100 000 (рис. 1Д).

Смертность от рака

Рак шейки матки. Всего с 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 4136 случаев смерти от РШМ, за год в среднем регистрировалось 460 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 56 865 случаев смерти от РШМ (в среднем 6318 в год).

Стандартизированные показатели смертности от РШМ с 2007 по 2015 гг. в Москве составляли от 3,9 до 4,7 на 100 000 женского населения, в среднем 4,2 на 100 000. В РФ — от 5,0 до 5,4 на 100 000 (5,2 в среднем) (рис. 2А).

Рак тела матки. С 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 4922 случаев смерти от рака тела матки, за год в среднем регистрировалось 547 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 58 614 случаев смерти от рака тела матки (в среднем 6513 в год).

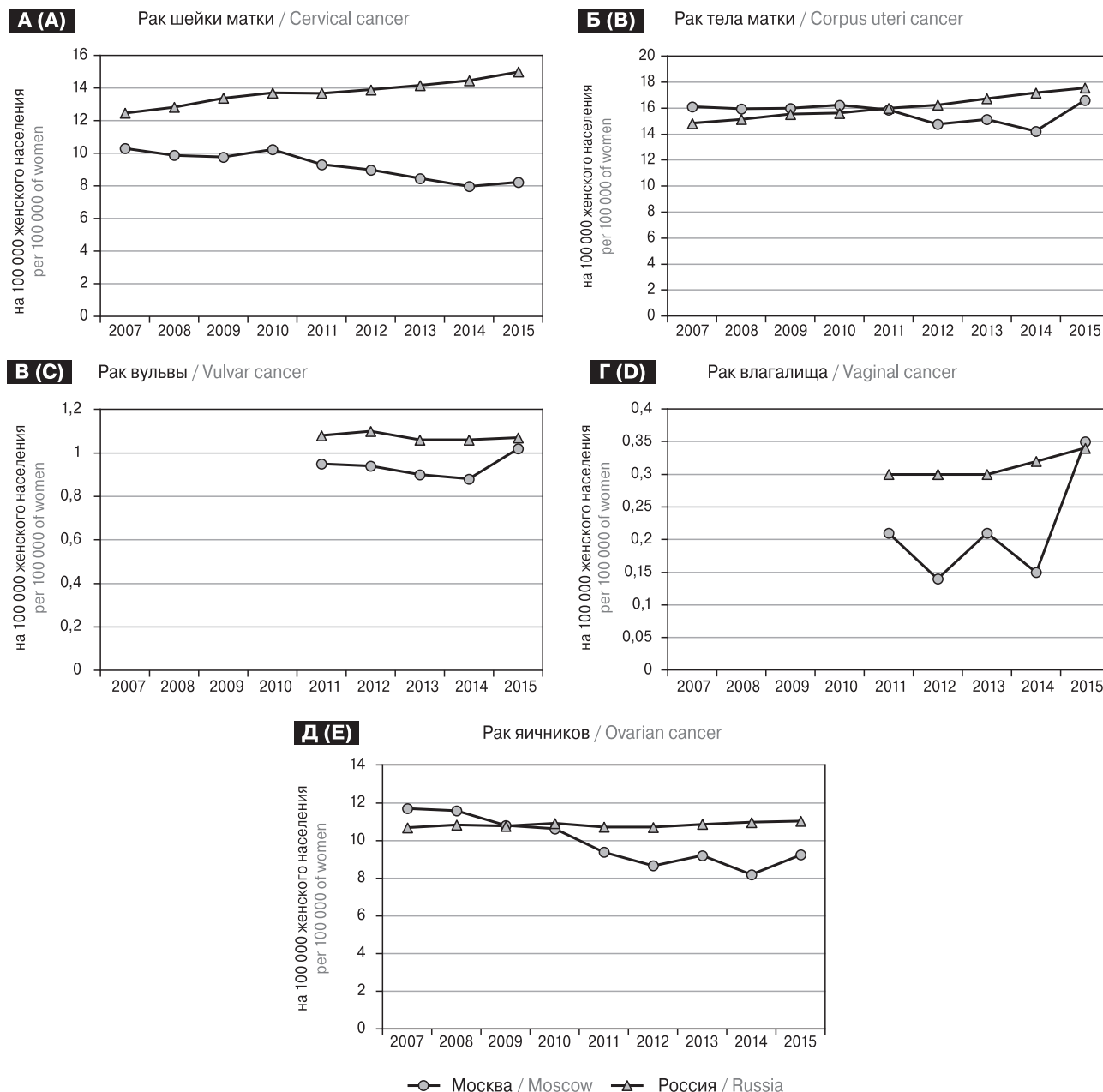


Рисунок 1. Стандартизированные показатели заболеваемости в Москве и в РФ за 2007–2015 гг.

Figure 1. Age-standardized incidence rates in Moscow and in Russia 2007–2015

Примечания. А. Заболеваемость раком шейки матки. Б. Заболеваемость раком тела матки. В. Заболеваемость раком вульвы. Г. Заболеваемость раком влагалища. Д. Заболеваемость раком яичников.

Notes. A. Cervical cancer incidence rates. B. Cancer of corpus uteri incidence rates. C. Vulvar cancer incidence rates. D. Vaginal cancer incidence rates. E. Ovarian cancer incidence rates.

Стандартизированные показатели смертности от рака тела матки с 2007 по 2015 гг. в Москве составляли от 3,7 до 4,3 на 100 000 женского населения, в среднем 4,0 на 100 000. В РФ — от 4,2 до 4,5 на 100 000 (4,3 в среднем) (рис. 2Б).

Рак яичников. С 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 6835 случаев смерти от рака яичников, за год в среднем регистрировалось 759 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 69 264 случаев смерти от рака яичников (в среднем 7696 в год).

Стандартизированные показатели смертности от рака яичников с 2007 по 2015 гг. в Москве составляли от 5,3 до 7,0 на 100 000 женского населения, в среднем 6,1 на 100 000. В РФ — от 5,3 до 5,8 на 100 000 (5,6 в среднем) (рис. 2В).

Рак других женских половых органов (С51, 52, 57–58). С 2007 по 2015 гг. в Москве зарегистрировано 1245 случаев смерти от рака вульвы, влагалища, плаценты и других женских половых органов, за год в среднем регистрировалось 7138 случаев. В РФ за данный период зарегистрировано 15 512 случаев смерти от рака данной локализации (в среднем 1724 в год).

Стандартизированные показатели смертности от рака вульвы, влагалища, плаценты и дру-

гих женских половых органов с 2007 по 2015 гг. в Москве составляли от 0,7 до 1,2 на 100 000 женского населения, в среднем 0,9 на 100 000. В РФ — от 1,0 до 1,1 на 100 000 (1,0 в среднем) (рис. 2Г).

Аногенитальные бородавки

В Российской Федерации показатель заболеваемости АБ (в целом, включая детей и подростков) в 2003–2015 гг. варьировал от 21,6 до 34,7 на 100 000 населения (в среднем 30,6). В последние 5 лет отмечается снижение заболеваемости с минимальным значением в 2015 г. (21,6 на 100 000 населения). В Москве аналогичный показатель составлял от 56,3 до 22,8 на 100 000, в среднем — 41,8. Минимальное его значение (22,8) также было отмечено в 2015 г.

Несмотря на снижение заболеваемости, доля АБ в структуре ИППП (для обоих полов) на территории Москвы выросла с 11,5% в 2003 г. до 25,7% в 2015 г. (максимум составлял 31,0% в 2014 г.) (рис. 3А–Г).

Наибольшая доля АБ среди ИППП отмечается в возрастных группах 15–17 лет (до 59,8% в 2012 г.) и 18–29 лет (до 37,3% в 2014 г.). По РФ в 2015 г. на АБ приходилось 11,7% от всех ИППП (для обоих полов).

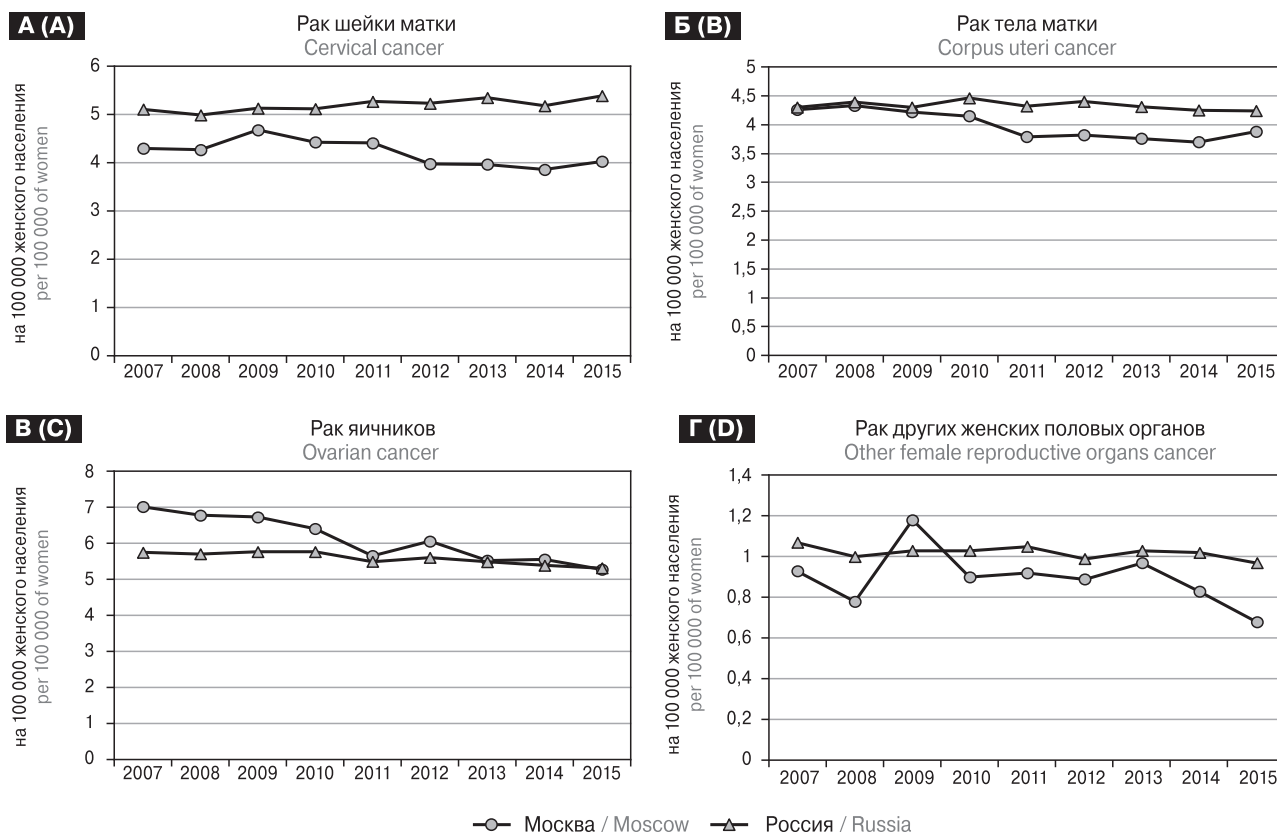


Рисунок 2. Стандартизированные показатели смертности в Москве и в РФ за 2007–2015 гг.

Figure 2. Age-standardized mortality rates in Moscow and in Russia 2007–2015

Примечания. А. Смертность от рака шейки матки. Б. Смертность от рака тела матки. В. Смертность от рака яичников. Г. Смертность от рака других женских половых органов

Notes. A. Cervical cancer mortality rates. B. Cancer of corpus uteri mortality rates. C. Ovarian cancer mortality rates. D. Cancers of other female genital organs mortality rates

Обсуждение

В последние десятилетия в РФ в целом отмечается рост заболеваемости и смертности от РШМ, однако такая ситуация характерна не для всех регионов страны. Например, в Москве данные показатели имеют тенденцию к снижению, что может быть связано с лучшей социально-экономической ситуацией в столице, а также с более активной работой по профилактике РШМ, в частности, с системой скрининга, позволяющей обнаруживать патологические изменения шейки матки на ранних стадиях и предотвращать развитие рака.

За анализируемый период доля РШМ в структуре заболеваемости онкогинекологическими новообразованиями населения Москвы составляла в среднем 23,7%, в структуре смертности от данных заболеваний — 24,1%; по РФ аналогичные показатели составили 29,8 и 28,3% соответственно. Помимо РШМ, на который приходится наибольшее число ВПЧ-ассоциированных раков среди женского населения, свой вклад вносят также злокачественные новообразова-

ния вульвы и влагалища, на которые приходится порядка 4,5% в структуре заболеваемости онкогинекологическими новообразованиями и схожая доля в структуре смертности от данных заболеваний. Данные цифры свидетельствуют о значительном вкладе ВПЧ-ассоциированной патологии в структуру онкогинекологической заболеваемости и смертности среди женщин, который сохраняется на стабильно высоком уровне.

Заболеваемость АБ, одним из самых распространенных заболеваний, передаваемых половым путем, в Российской Федерации и в Москве в последнее десятилетие имеет тенденцию к снижению. Однако показатели заболеваемости остаются на достаточно высоком уровне, особенно в возрастной группе 18–29 лет, а отмеченное снижение заболеваемости может во многом быть обусловлено недоучетом значительного числа случаев заболеваний, что характерно для группы инфекций, передающихся половым путем.

В структуре ИППП по Москве АБ переместились с 5-го (в 2003 г.) на 1-е (в 2015 г.) ранговое место, обойдя сифилис, гонорею, трихомоноз и хламидиоз.

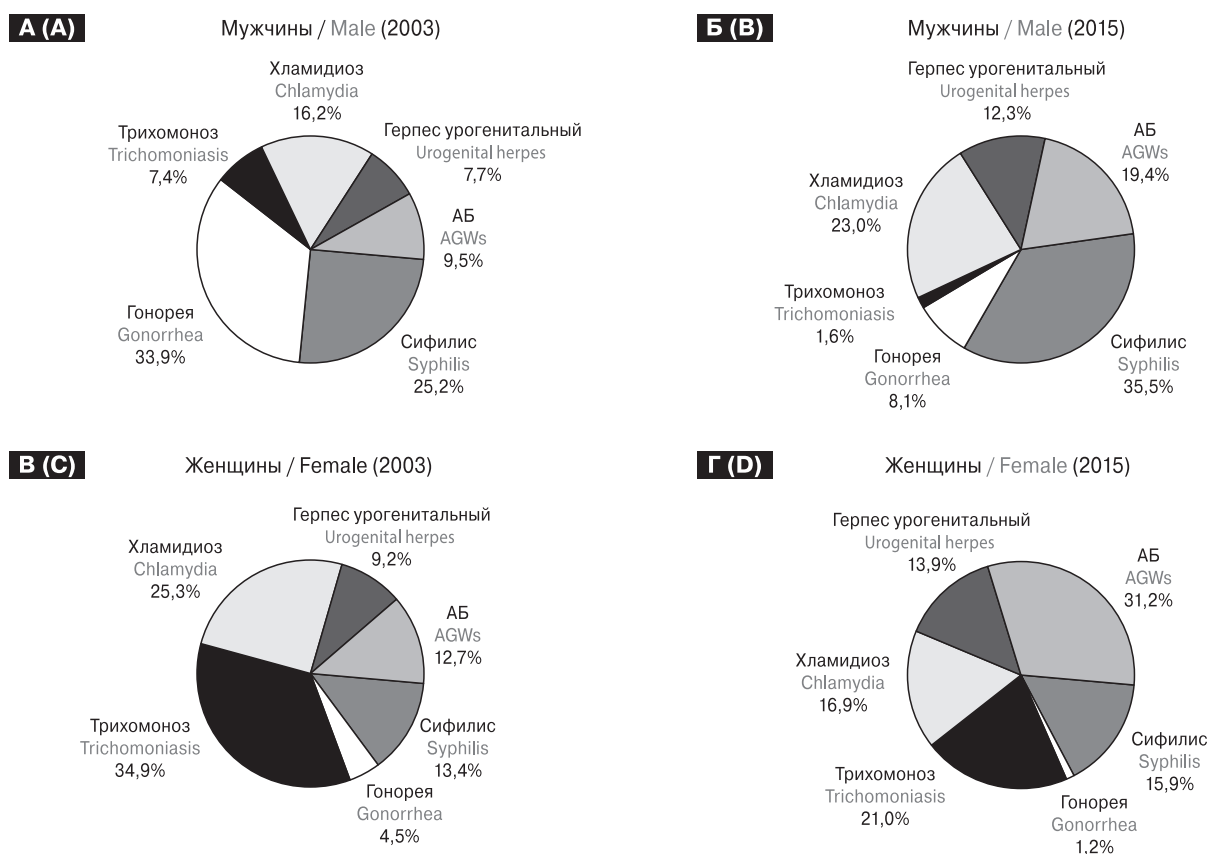


Рисунок 3. Изменение доли аногенитальных (венерических) бородавок в структуре ИППП в Москве (2003 и 2015 гг.)

Figure 3. Changes in the proportion of AGWs in the STIs structure in Moscow (2003 and 2015)

Примечания: А. Доля АБ среди мужского населения в 2003 г. Б. Доля АБ среди мужского населения в 2015 г.

В. Доля АБ среди женского населения в 2003 г. Г. Доля АБ среди женского населения в 2015 г.

Notes: A. The proportion among men in 2003. B. The proportion among men in 2015. C. The proportion among women in 2003. D. The proportion among women in 2015.

ВПЧ-ассоциированные заболевания (РШМ и АБ) занимают существенное место в структуре как онкогинекологических новообразований, так и ИППП. Улучшение ситуации с онкогинекологическими заболеваниями и ИППП может быть достигнуто за счет эффективных мер профилактики ВПЧ-инфекции, к которым относятся скрининг и вакцинопрофилактика.

К сожалению, на текущий момент скрининг в России носит скорее оппортунистический характер, не превышая 30% женского населения. В связи с этим имеется острая необходимость в разработке программы скринингового обследования женщин на ВПЧ-патологию по анало-

гии с программами, введенными в таких странах, как Австралия, Великобритания и др.

Несмотря на то, что Национальный календарь профилактических прививок в РФ в последние годы расширился (включена вакцинация против пневмококковой инфекции, гемофильной инфекции типа b), он по-прежнему не включает в себя вакцинацию против ВПЧ-инфекции. Это единственное его отличие от Национальных программ иммунизации большинства развитых стран. Даже в разделе «по эпидемическим показаниям» папилломавирусная инфекция в календаре не представлена.

Список литературы/References

1. Злокачественные новообразования в России в 2007 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2009. 244 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2007 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2007 (morbidity and mortality). Eds. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Rosmedtehnologii, 2009. 244 p.*
2. Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2010. 256 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2008 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2008 (morbidity and mortality). Eds. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Rosmedtehnologii, 2010. 256 p.*
3. Злокачественные новообразования в России в 2009 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрaвооцразвития России, 2011. 260 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2009 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2009 (morbidity and mortality). Eds. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Minzdravotsrazvitiya Rossii, 2011. 260 p.*
4. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрaвооцразвития России, 2012. 260 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2010 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2010 (morbidity and mortality). Eds. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Minzdravotsrazvitiya Rossii, 2012. 260 p.*
5. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрaва России, 2013. 289 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2011 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2011 (morbidity and mortality). Eds. Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Minzdrava Rossii, 2013. 289 p.*
6. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрaва России, 2014. 250 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2012 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2012 (morbidity and mortality). Eds. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena Minzdrava Rossii, 2014. 250 p.*
7. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрaва России, 2015. 250 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2013 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2013 (morbidity and mortality). Eds. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena – filial FGU «FMI im. P.A. Gercena» Minzdrava Rossii, 2015. 250 p.*
8. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГУ «НМИРЦ» Минздрaва России, 2016. 250 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2014 (morbidity and mortality). Eds. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena filial FGU «NMIRTs» Minzdrava Rossii, 2016. 250 p.*
9. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрaва России, 2017. 250 с. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2015 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod red. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V. [Malignancies in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Eds. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.]. *Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena – filial FGU «NMIRTs» Minzdrava Rossii, 2017. 250 p.*

10. Bosch F.X., Broker T.R., Forman D., Moscicki A.B., Gillison M.L., Doorbar J., Stern P.L., Stanley M., Arbyn M., Poljak M., Cuzick J., Castle P.E., Schiller J.T., Markowitz L.E., Fisher W.A., Canfell K., Denny L.A., Franco E.L., Steben M., Kane M.A., Schiffman M., Meijer C.J., Sankaranarayanan R., Castellsagué X., Kim J.J., Brotons M., Alemany L., Albero G., Diaz M., de Sanjosé S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*, 2013, vol. 31, suppl. 7, pp. H1–H31. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.003
11. Cubie H.A. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 2013, vol. 445, iss. 1–2, pp. 21–34. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.007
12. De Vuyst H., Clifford G.M., Nascimento M.C., Madeleine M.M., Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int. J. Cancer*, 2009, vol. 124, iss. 7, pp. 1626–1636. doi: 10.1002/ijc.24116
13. Forman D., de Martel C., Lacey C.J., Soerjomataram I., Lortet-Tieulent J., Bruni L., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Plummer M., Franceschi S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 2012, vol. 30, suppl. 5, pp. F12–F23. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.055
14. Li N., Franceschi S., Howell-Jones R., Snijders P.J., Clifford G.M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer*, 2011, vol. 128, iss. 4, pp. 927–935. doi: 10.1002/ijc.25396
15. Schiffman M.H., Bauer H.M., Hoover R.N., Hoover R.N., Glass A.G., Cadell D.M., Rush B.B., Scott D.R., Sherman M.E., Kurman R.J., Wacholder S., Stanton C.K., Manos M.M. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1993, vol. 85, iss. 12, pp. 958–964. doi: 10.1093/jnci/85.12.958
16. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, no. 2, pp. 342–350. doi: 10.1038/nrc798
17. Zur Hausen H. Papillomavirus in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 2009, vol. 384, iss. 2, pp. 260–265. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.046
18. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*, 2009, vol. 392, iss. 1, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.virol.2009.06.001
19. World Health Organization. World Cancer Report 2014. Eds. Stewart B.W., Wild C.P. 2014, 630 p. URL: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> (29.12.2017)

Авторы:

Брико Н.И., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия;

Лопухов П.Д., аспирант кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия;

Каприн А.Д., академик РАН, д.м.н., профессор, директор Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена (МНИОИ им. П.А. Герцена), Москва, Россия;

Новикова Е.Г., д.м.н., профессор, руководитель отделения онкогинекологии МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия;

Трушина О.И., д.м.н., старший научный сотрудник онкогинекологического отделения МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия;

Халдин А.А., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАЕН, главный научный сотрудник ГБУЗ Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения города Москвы (МНПЦДК ДЗМ), Москва, Россия;

Жукова О.В., д.м.н., главный врач МНПЦДК ДЗМ, Москва, Россия;

Исаева Д.Р., врач-дерматовенеролог МНПЦДК ДЗМ, Москва, Россия;

Скворцова А.И., врач-методист организационно-методического кабинета по дерматовенерологии МНПЦДК ДЗМ, Москва, Россия.

Authors:

Briko N.I., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Epidemiology and Evidence-based Medicine, Sechenov University, Moscow, Russian Federation;

Lopukhov P.D., PhD Student, Department of Epidemiology and Evidence-based Medicine, Sechenov University, Moscow, Russian Federation;

Kaprin A.D., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Novikova E.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Gynaecologic Oncology Department P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Trushina O.I., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Gynaecologic Oncology Department P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Khaldin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, RANS Corresponding Member, Head Researcher, Moscow Research and Practical Center of Dermatology, Venereology and Cosmetology (MRPCDVC), Moscow, Russian Federation;

Zhukova O.V., PhD, MD (Medicine), Chief Doctor of Moscow Research and Practical Center of Dermatology, Venereology and Cosmetology (MRPCDVC), Moscow, Russian Federation;

Isaeva D.R., Dermatovenerologist of Moscow Research and Practical Center of Dermatology, Venereology and Cosmetology (MRPCDVC), Moscow, Russian Federation;

Skvortsova A.I., Physician-methodologist of the Organizational and Methodical Cabinet on Dermatovenereology of Moscow Research and Practical Center of Dermatology, Venereology and Cosmetology (MRPCDVC) Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.07.2017
Отправлена на доработку 06.12.2017
Принята к печати 08.12.2017

Received 19.07.2017
Revision received 06.12.2017
Accepted 08.12.2017

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ РОССИИ: 10 ЛЕТ СПУСТЯ

А.А. Вязовая¹, Г.М. Ахмедова², Н.С. Соловьева³, А.А. Герасимова¹, Д.А. Старкова¹,
Е.Н. Туркин², В.Ю. Журавлев³, О.В. Нарвская^{1,3}, И.В. Мокроусов¹

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

² ГБУЗ Противотуберкулезный диспансер Калининградской области, г. Калининград, Россия

³ ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В Калининградской области за последние десять лет заболеваемость туберкулезом существенно снизилась (с 134/100 000 в 2006 г. до 50,6/100 000 в 2015 г.), однако по-прежнему превышает средний показатель по Северо-Западному федеральному округу — 40,7/100 000. Учитывая увеличение удельного веса первичной множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя с 23,9% в 2010 г. до 30,5% в 2015 г., целью настоящего исследования был анализ современной структуры популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Калининградской области и оценка тенденций ее изменения в пространственно-временном контексте. Было изучено 73 изолята *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в 2015 г. Лекарственная устойчивость (ЛУ) выявлена у 46 (63,0%) штаммов *M. tuberculosis*, из них 32 (43,8%) обладали мультирезистентностью. Установлена принадлежность к генотипу Beijing 46 (63,0%) из 73 штаммов *M. tuberculosis*. Доля кластера B0/W148 генотипа Beijing составила 19,2% (14 из 73). Сполиготипирование 27 штаммов non-Beijing *M. tuberculosis* позволило выделить 15 сполиготипов 5 генетических семейств — T, LAM, Ural, S, X. Около половины (16; 51,6%) штаммов non-Beijing были представлены сполиготипами — SIT42, SIT53, SIT262, SIT444. В гетерогенной группе T преобладали преимущественно лекарственно чувствительные штаммы сполиготипа SIT53. Более половины (55,6%) штаммов генотипа LAM проявляли ЛУ. Семейство Ural было малочисленно (5,5%) и включало в себя штаммы *M. tuberculosis*, сполиготипы которых хорошо известны в России — SIT35 и SIT262, так и один новый, ранее не встречавшийся. МЛУ статистически значимо была связана с генотипом Beijing: 56,5% против 25,9% у штаммов прочих генотипов (суммарно) ($P = 0,0134$). При этом все 14 штаммов эпидемиологически и клинически значимого кластера B0/W148 были мультирезистентными. Доля МЛУ штаммов генотипа Beijing существенно не изменилась: в 2006 г. — 61,3%, в 2015 г. — 56,5% ($P = 0,6773$). Однако расширился спектр лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам первого ряда: если ранее большинство (78,9%) МЛУ штаммов дополнительно проявляли устойчивость лишь к стрептомицину, то в настоящем исследовании 72,0% МЛУ штаммов были устойчивы к стрептомицину, этамбутолу и пиперазину. Доля МЛУ штаммов non-Beijing составила 25,9%, что существенно выше аналогичного показателя 2006 г. — 2,2% ($P = 0,0124$). Сравнительно меньшая доля штаммов генотипа Beijing (50%) обнаружена у больных туберкулезом, проживающих на побережье Балтийского моря, регионе с относительно благополучной социально-экономической ситуацией и более высоким качеством жизни населения.

Адрес для переписки:

Вязовая Анна Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: (812) 233-21-49. Факс: (812) 233-20-92.
E-mail: annavyazovaya@pasteur.org.ru

Contacts:

Anna A. Vyazovaya
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-21-49. Fax: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: annavyazovaya@pasteur.org.ru

Библиографическое описание:

Вязовая А.А., Ахмедова Г.М., Соловьева Н.С., Герасимова А.А.,
Старкова Д.А., Туркин Е.Н., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В.,
Мокроусов И.В. Молекулярная эпидемиология туберкулеза
в Калининградской области России: 10 лет спустя // Инфекция
и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 367–374. doi: 10.15789/2220-7619-2017-
4-367-374

Citation:

Vyazovaya A.A., Akhmedova G.M., Solovieva N.S., Gerasimova A.A.,
Starkova D.A., Turkin E.N., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V.
Molecular epidemiology of tuberculosis in the Kaliningrad region of Russia:
10 years after // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 367–374. doi: 10.15789/2220-7619-2017-
4-367-374

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-14-00292)

Таким образом, современную эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в Калининградской области критически определяет нарастающая циркуляция МЛУ штаммов генетического семейства Beijing, а также существенное увеличение доли МЛУ штаммов других генотипов.

Ключевые слова: туберкулез легких, молекулярная эпидемиология, Калининградская область, *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, сполитотипирование, генотип Beijing.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS IN THE KALININGRAD REGION OF RUSSIA: 10 YEARS AFTER

Vyazovaya A.A.^a, Akhmedova G.M.^b, Solovieva N.S.^c, Gerasimova A.A.^a, Starkova D.A.^a, Turkin E.N.^b, Zhuravlev V.Yu.^c, Narvskaya O.V.^{a,c}, Mokrousov I.V.^a

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

^b Tuberculosis Dispensary of the Kaliningrad region, Kaliningrad, Russian Federation

^c Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In the Kaliningrad region, the incidence of tuberculosis (TB) has declined significantly over the past decade (from 134/100 000 in 2006 to 50.6/100 000 in 2015), but still exceeds the average for the North-West Russia (40.7/100 000). In view of the increase in the proportion of primary multidrug resistance (MDR) of the causative agent from 23.9% in 2010 to 30.5% in 2015, the aim of this study was to analyze the current *Mycobacterium tuberculosis* population structure in the Kaliningrad region and to evaluate its spatial-temporal trends. The 73 *M. tuberculosis* isolates from patients with pulmonary TB newly diagnosed in 2015 were studied. Drug resistance (DR) was detected in 46 (63.0%) *M. tuberculosis* strains; of these, 32 (43.8%) were multidrug-resistant (MDR). The 46 (63.0%) of 73 *M. tuberculosis* strains were of the Beijing genotype with 19.2% (14 out of 73) share of the B0/W148 cluster. Spoligotyping of 27 non-Beijing *M. tuberculosis* strains made it possible to identify 15 spoligotypes of 5 genetic families — T, LAM, Ural, S, X. About half (16; 51.6%) of non-Beijing strains were represented by spoligotypes — SIT42, SIT53, SIT262, and SIT444. In a heterogeneous group T, mostly drug-susceptible strains of spoligotype SIT53 were prevailing. More than half (55.6%) of the LAM genotype strains exhibited DR. The Ural family was small (5.5%) and included strains of well-known in Russia *M. tuberculosis* spoligotypes SIT35 and SIT262, and one new, not found previously. MDR was statistically significantly associated with the Beijing genotype: 56.5% versus 25.9% in strains of other genotypes (in total) ($P = 0.0134$). Moreover, all 14 strains of epidemiologically and clinically significant B0/W148 cluster were MDR. The proportion of MDR strains of the Beijing genotype did not change significantly: in 2006 it was 61.3%, in 2015 — 56.5% ($P = 0.6773$). However, the spectrum of drug resistance to first-line anti-TB drugs expanded. If previously the majority (78.9%) of MDR strains additionally exhibited resistance to streptomycin only, in present study 72.0% of MDR strains were resistant to streptomycin, ethambutol, and pyrazinamide. The proportion of MDR strains of non-Beijing genotypes was 25.9%, a significantly higher than the similar indicators in 2006 — 2.2% ($P = 0.0124$). A relatively smaller proportion of strains of the Beijing genotype (50%) was found in TB patients from the shores of the Baltic Sea, a territory with a relatively more favorable socio-economic situation and a higher standard of living. Thus, the current epidemiological situation of TB in the Kaliningrad region is crucially determined by the growing circulation of MDR Beijing family strains, as well as a significant increase in the proportion of MDR strains of other genotypes.

Key words: pulmonary tuberculosis, molecular epidemiology, Kaliningrad region, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, spoligotyping, Beijing genotype.

Введение

Туберкулез (ТБ) остается одной из основных проблем здравоохранения. В Европейском регионе ВОЗ в 2015 г. было зарегистрировано около 323 000 новых случаев и 32 000 смертей от ТБ, в основном, в странах Восточной (в том числе и России) и Центральной Европы, где, по оценкам ВОЗ, был выявлен один из пяти случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) (<http://www.euro.who.int/tb>). При этом доли МЛУ-ТБ среди впервые выявленных и ранее леченных больных составили 16 и 48% соответственно. В список 18 стран Европы с высоким бременем МЛУ-ТБ, помимо

Российской Федерации (РФ), входят Беларусь, Украина, Латвия, Эстония, Литва (<http://www.euro.who.int/tb>).

Калининградская область является географически уникальным регионом, так как это самая западная территория и полуэксклав России, окруженный Балтийским морем и сухопутными границами: на юге — с Польшей, а на севере и востоке — с Литвой. Калининград является вторым по численности населения (первый — Санкт-Петербург) городом Северо-Западного региона РФ и одним из шести основных центров внутреннего миграционного притяжения в России за последние два десятилетия (<http://demoscope.ru/weekly/2014/0595/demoscope595>).

pdf). В центральной части Калининградской области находится пересечение двух важнейших транспортных осей области: «Запад–Восток» (Калининград–Вильнюс) и «Север–Юг» (Черняховск–Рига).

За последние десять лет заболеваемость ТБ на территории области существенно снизилась (с 134/100 000 в 2006 г. до 50,6/100 000 в 2015 г.), однако по-прежнему превышает средний показатель по Северо-Западному федеральному округу (СЗФО) — 40,7/100 000 (РФ — 57,7/100 000) (<http://mednet.ru/i>). Согласно оценке ВОЗ, в 2015 г. в соседних странах заболеваемость ТБ на 100 000 населения и доля МЛУ-ТБ составили: в Литве — 56 и 23,2%, в Польше — 19 и 0,9% (www.who.int/tb/data) (рис. 1).

Понимание молекулярной структуры локальных популяций *Mycobacterium tuberculosis* и выявление наиболее эпидемиологически и/или клинически значимых геновариантов имеет значение для информированной реализации локальных и региональных программ борьбы с ТБ и выработки адекватных мер эпидемиологического надзора. В частности, наше предыдущее исследование популяции *M. tuberculosis*

в Калининградской области в 2006 г. определило основные циркулирующие генотипы возбудителя и установило ассоциацию штаммов генетического семейства Beijing с МЛУ [17].

Учитывая увеличение удельного веса первичной МЛУ возбудителя с 23,9% в 2010 г. до 30,5% в 2015 г., целью настоящего исследования был анализ современной структуры популяции *M. tuberculosis* в Калининградской области и оценка тенденций ее изменения в пространственно-временном контексте.

Материалы и методы

Согласно официальным данным в Калининградской области в 2015 г. выявлено 395 больных туберкулезом легких, из них 249 бактериовыделителей. Исходными критериями включения в исследование являлись: 1) впервые выявленный туберкулез легких; 2) возраст старше 18 лет; 3) постоянное проживание в Калининграде и Калининградской области; 4) наличие изолята *M. tuberculosis*. Из сформированной выборки (n = 216) в исследование было включено 73 произвольно отобранных изолята: 53 получены от мужчин

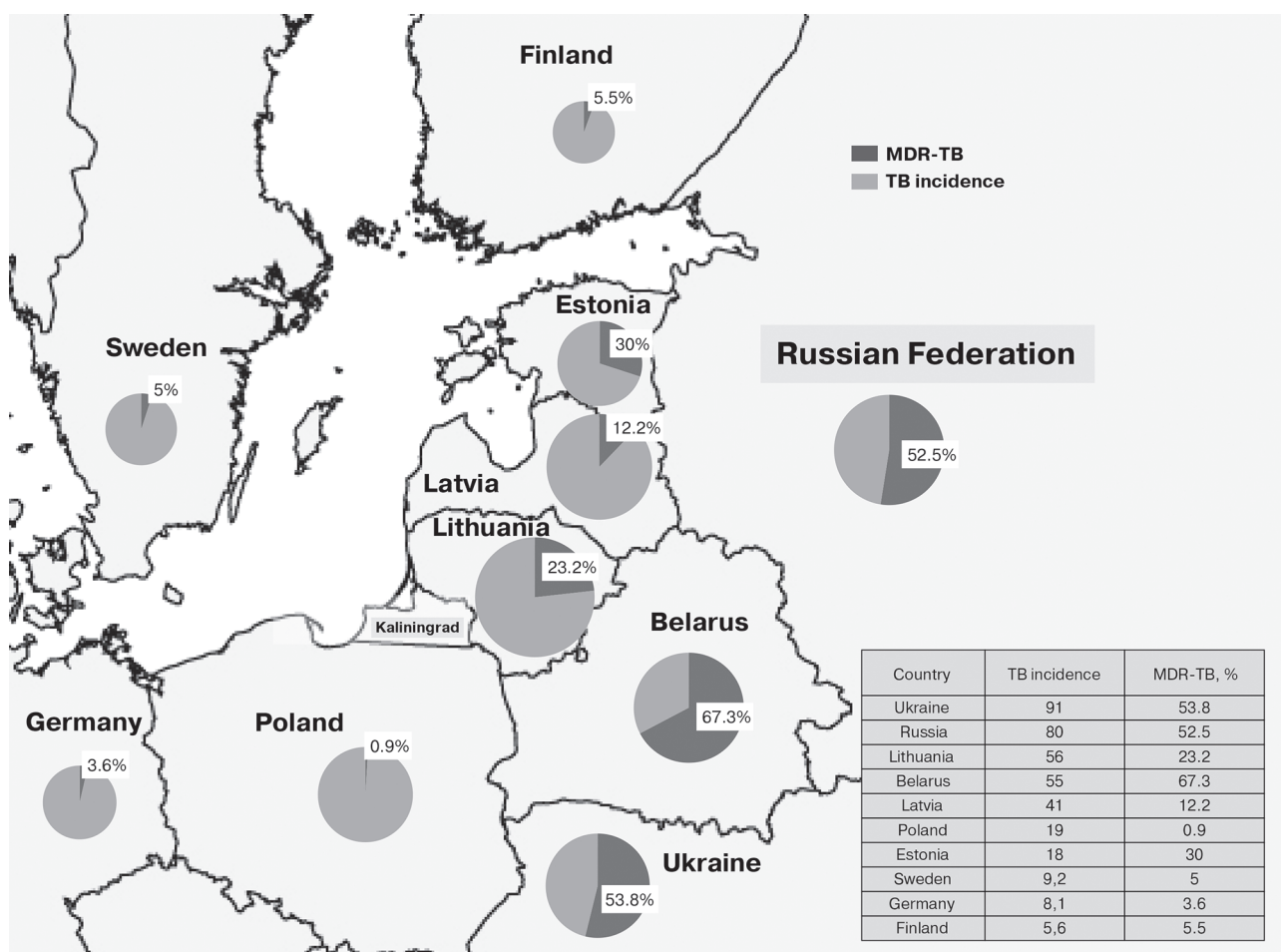


Рисунок 1. Заболеваемость ТБ (на 100 000 населения) и доля МЛУ-ТБ (согласно оценке ВОЗ, 2015 г.)
Figure 1. The estimated TB incidence (per 100 000 population) and the proportion of MDR-TB (WHO, 2015)

Таблица 2. Генотипы и лекарственная устойчивость штаммов *M. tuberculosis*Table 2. Genotypes and drug resistance of *M. tuberculosis* strains

Генотип Genotype	ЛЧ Sensitive (n = 26)	Моно-/ Полирезистентные Mono-/Polyresistant (n = 14)	МЛУ MDR (n = 33)	Всего Total (n = 73)
Beijing	12	8	26	46
Beijing B0/W148-кластер/Beijing B0/W148-cluster	0	0	14	14
Beijing другие/Beijing, other	12	8	12	32
Non-Beijing	14	6	7	27
LAM	4	2	3	9
T	7	1	3	11
Ural	1	2	1	4
S	0	1	0	1
X	1	0	0	1
Unknown	1	0	0	1

странах Европы распространенность штаммов Beijing относительно невелика: Финляндия — 5,2%, Швеция — 5,8%, Польша — 6,5%, причем их источники иные и более разнообразные, включая, в частности, штаммы, занесенные из Восточной Азии [6, 11, 24].

Известно, что на Северо-Западе России в популяции *M. tuberculosis* генотипа Beijing широко представлены штаммы кластера B0/W148, ранее определенного как успешный российский вариант микобактерий туберкулеза [14]. Этот геновариант был впервые выявлен в середине-конце 1990-х гг. [4, 13, 23] и характеризуется значимой ассоциацией с МЛУ и повышенной кластеризацией (даже при сравнении с другими вариантами семейства Beijing) [14]. Была показана высокая способность штаммов B0/W148 к распространению (трансмиссивность), в том числе описан случай нозокомиальной передачи [21]. В нашем исследовании доля штаммов кластера B0/W148 генотипа Beijing составила 19,2%, что выше, чем в европейской части России и сходно с ситуацией в Сибири, где доля B0/W148 составляла 20–22% [14]. В то же время при таких сравнениях следует учитывать, что предыдущие исследования проводились в разные годы.

Генотипирование остальных 27 штаммов *M. tuberculosis* (non-Beijing) позволило выделить 15 сполитипов 5 генетических семейств — T, LAM, Ural, S, X и один неклассифицированный (Unknown) (табл. 1). Из таблицы 1 видно, что около половины из них (51,6%) были представлены сполитипами — SIT42, SIT53, SIT262, SIT444; 11 (38,7%) штаммов были уникальны (в том числе один — с новым сполитипографом). Более половины (55,6%) штаммов генотипа LAM проявляли ЛУ (табл. 2). Распределение штаммов LAM в Северо-Западном регионе России неоднородно. Так, если в Карелии и Ленинградской области их доля составляла 10,3% (что сопоставимо с Финляндией — 7,3%), то в Псковской области превышала 20%, что близ-

ко к показателю в Эстонии (17,8%) [1, 3, 18, 24, 25]. В Беларуси и Украине штаммы семейства LAM занимают второе место по распространенности (около 23%) после Beijing и в структуре МЛУ штаммов (39,5 и 22,9% соответственно) [7, 22, 28].

В гетерогенной группе T преобладали преимущественно ЛЧ (83,3%) штаммы сполитипа SIT53 — 8,2% (табл. 1), что соответствует данным по Беларуси и Украине [22, 28]. Напротив, в Польше SIT53 (12,5%) чаще встречался среди ЛУ штаммов [11].

Штаммы Ural (5,5%) были малочисленны, что сопоставимо с суммарными данными по СЗФО РФ и Финляндии [2, 18, 24]. В то же время в последние годы отмечен рост циркуляции ассоциированного с МЛУ субтипа семейства Ural в ряде стран Восточной Европы (Молдова, Литва) и на Северо-Западе России [2, 15]. Малая выборка штаммов в изученной популяции и отсутствие данных по высокоразрешающему генотипированию не позволяют сделать какой-либо определенный вывод о влиянии популяции этого генотипа в соседней Литве (где штаммы Ural ассоциированы с МЛУ) на ситуацию в Калининградской области РФ. Следует отметить, что только один из четырех штаммов Ural в нашей выборке был чувствительным к ПТП.

В целом в Калининградской области доли ЛУ и МЛУ штаммов non-Beijing составили 48,1 и 25,9% (табл. 2), что существенно выше аналогичных показателей 2006 г. — 13,0% ($P = 0,0018$; $OR = 6,19$ [1,97–19,41]) и 2,2% ($P = 0,0124$; $OR = 15,75$ [1,82–136,64]) [17].

В регионах России значительная доля всех случаев МЛУ-ТБ ассоциирована со штаммами Beijing. В нашей работе МЛУ также статистически значимо была связана с генотипом Beijing: 56,5% против 25,9% у штаммов прочих генотипов (суммарно) ($P = 0,0134$; $OR = 3,71$ [1,31–10,50]) (табл. 2). При этом все 14 штаммов

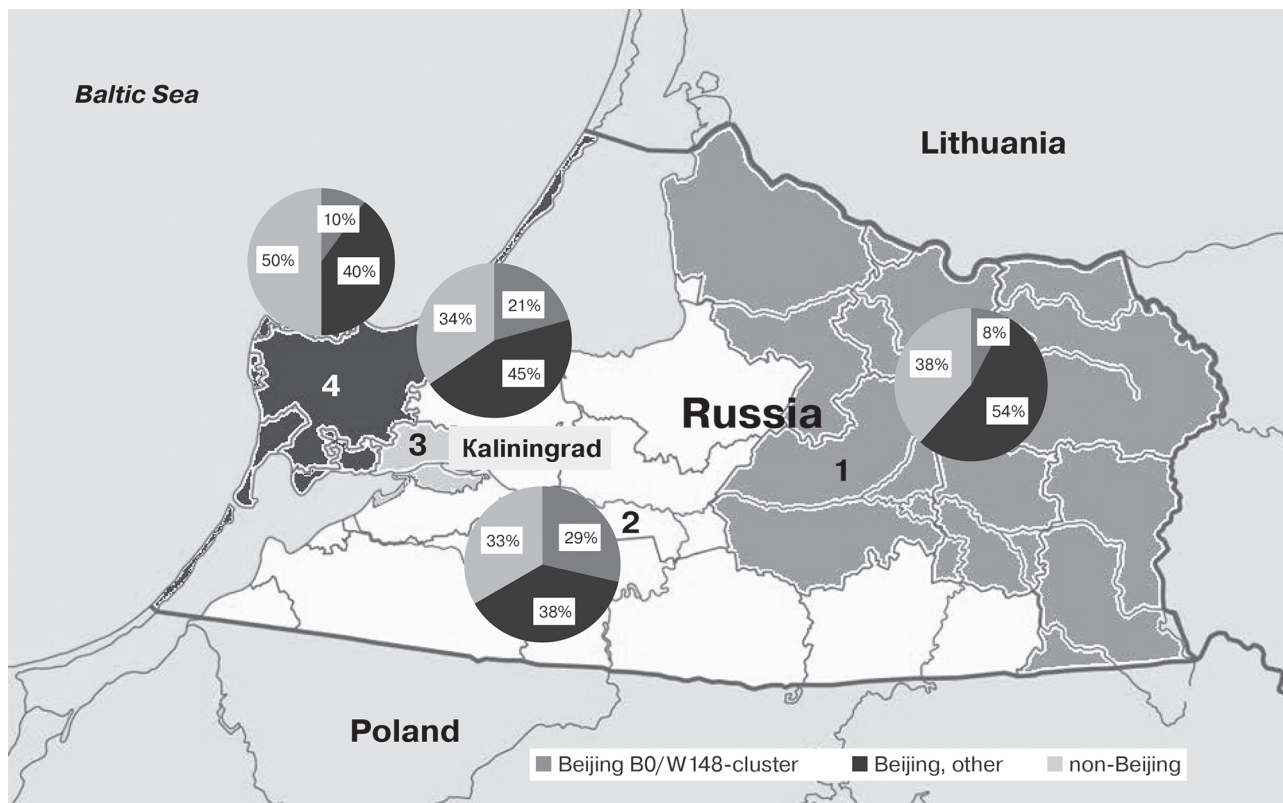


Рисунок 2. Генотипы *M. tuberculosis* в Калининградской области

Figure 2. Genotypes of *M. tuberculosis* in the Kaliningrad region

Примечание. Территории: восточная (1), западная (2), Калининград (3), побережье Балтийского моря (4).
 Note. Areas: eastern (1), western (2), Kaliningrad (3), the Baltic Sea shore (4).

кластера B0/W148 были мультирезистентными и проявляли устойчивость к стрептомицину. В Эстонии, Латвии, Беларуси и Украине штаммы Beijing явились причиной 67,2 и 57,8%, 40,7 и 35,4% случаев МЛУ-ТБ соответственно [7, 12, 22, 26, 28], тогда как в Польше — лишь 8,7% [9].

Следует отметить, что за прошедшее десятилетие в Калининградской области доля МЛУ штаммов генотипа Beijing существенно не изменилась: в 2006 г. — 61,3% [17], в 2015 г. — 56,5% ($P = 0,6773$; $OR = 0,82 [0,32–2,08]$) (табл. 2). Однако расширился спектр устойчивости к ПТП первого ряда: если ранее МЛУ штаммы дополнительно проявляли устойчивость лишь к стрептомицину (78,9%), то в настоящее время большинство (72,0%) МЛУ штаммов обладают резистентностью к стрептомицину, этамбутолу и пиперазину.

Для сравнительной характеристики популяции *M. tuberculosis* внутри региона Калининградскую область условно разделили на территории: восточную (1), западную (2), Калининград (3) и побережье Балтийского моря (4) (рис. 2). На рис. 2 видно, что штаммы генотипа Beijing выявлены примерно в равных долях в восточной (62,0%) и западной (77%) частях области и в Калининграде (76%). Согласно данным Противотуберкулезного диспансера

Калининградской области здесь в 2015 г. зарегистрированы следующие показатели заболеваемости ТБ: 54,4/100 000 (1), 74,2/100 000 (2) и 46,5/100 000 (3).

Распределение штаммов кластера B0/W148 неоднородно, и наибольшая часть выявлена в западной части Калининградской области (29%). Сравнительно меньшая доля штаммов генотипа Beijing (50%) обнаружена у больных туберкулезом, проживающих на побережье Балтийского моря (рис. 2), где показатель заболеваемости туберкулезом в 2015 г. составил 29,5/100 000. При этом на данной территории более благополучная социально-экономическая ситуация и высокий уровень качества жизни населения [5].

Заключение

В Калининградской области у впервые выявленных больных туберкулезом легких в структуре популяции возбудителя доминирует генотип Beijing (63,0%), причем в течение 10-летнего периода наблюдения (с 2006 по 2015 гг.) его доля возросла на 22,7%. Подавляющее большинство МЛУ штаммов (83,3%) принадлежали к генотипу Beijing, при этом все штаммы кластера Beijing B0/W148 (19,2%) были

мультирезистентными. Вместе с тем, существенно возросла доля МЛУ штаммов других генетических групп (суммарно): с 2,2% в 2006 г. до 25,9% в 2015 г. Наиболее распространенными среди других генотипов остаются сполитотипы SIT42 (LAM) и SIT53 (T). Таким образом,

современную эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в Калининградской области критически определяет нарастающая циркуляция МЛУ штаммов генетического семейства Beijing, а также существенное увеличение доли МЛУ штаммов других генотипов.

Список литературы/References

1. Вязовая А.А., Ветров В.В., Лялина Л.В., Мокроусов И.В., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Вишневецкий Б.И., Нарвская О.В. Характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (по материалам 15-летнего наблюдения в Ленинградской области) // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 34–40. [Vyazovaya A.A., Vetrov V.V., Lyalina L.V., Mokrousov I.V., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Y., Vishnevskiy B.I., Narvskaya O.V. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains (a 15-year survey in Leningrad region, Russia). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 34–40. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-34-40 (In Russ.)]
2. Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Журавлев В.Ю., Соловьева Н.С., Оттен Т.Ф., Маничева О.А., Вишневецкий Б.И., Нарвская О.В. Молекулярная характеристика мультирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-Западе России // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. № 1. С. 30–33. [Vyazovaya A.A., Mokrousov I.V., Zhuravlev V.Yu., Solovieva N.S., Otten T.F., Manicheva O.A., Vishnevskiy B.I., Narvskaya O.V. Molecular characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Northwest Russia. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 2016, no. 1, pp. 30–33. (In Russ.)]
3. Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Сунчала Т.В., Мокроусов И.В., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В. Характеристика популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Карелия // Туберкулез и болезни легких. 2016. № 8. С. 48–53. [Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Sunchalina T.V., Mokrousov I.V., Zhuravlev V.Y., Narvskaya O.V. Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* population in Republic of Karelia. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, no. 8, pp. 48–53. doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-8-48-53 (In Russ.)]
4. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневецкий Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-Западе России // Проблемы туберкулеза. 1999. № 3. С. 39–41. [Narvskaya O.V., Mokrousov I.V., Otten T.F., Vishnevskiy B.I. Genetic marking of polyresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the north-west of Russia. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 1999, no. 3, pp. 39–41 (In Russ.)]
5. Шульженко С., Семенчук Н.О. Социально-экономическое развитие административно-территориальных образований как ключевой фактор прогресса эксклавного региона РФ // Молодой ученый. 2015. № 10.2. С. 20–26. [Shulzhenko S., Semenchuk N.O. Socio-economic development of administrative-territorial entities as a key factor in the progress of the exclave region of the Russian Federation. *Molodoi uchenyi = Young scientist*, 2015, no. 10.2, pp. 20–26 (In Russ.)]
6. Brudey K., Gordon M., Mostrom P., Svensson L., Jonsson B., Sola C., Ridell M., Rastogi N. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 7, pp. 3046–3051.
7. Дымова М.А., Liashenko O.O., Poteiko P.I., Krutko V.S., Khrapov E.A., Filipenko M.L. Genetic variation of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine. *BMC Infect. Dis.*, 2011, vol. 11:77.
8. Gibson A., Huard R., Gey van Pittius N., Lazzarini L., Driscoll J., Kurepina N., Zozio T., Sola C., Spindola S., Kritski A., Fitzgerald D., Kremer K., Mardassi H., Chitale P., Brinkworth J., Garcia de Viedma D., Gicquel B., Pape J., Van Soolingen D., Kreiswirth B., Warren R., Van Helden P., Rastogi N., Suffys P., Lapa e Silva J., Ho J. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 4, pp. 1259–1267.
9. Jagielski T., Augustynowicz-Kopeć E., Zozio T., Rastogi N., Zwolska Z. Spoligotype-Based Comparative Population structure analysis of multidrug-resistant and isoniazid-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Poland. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, no. 11, pp. 3899–3909.
10. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Van Agterveld M., Van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 4, pp. 907–914.
11. Kozińska M., Zientek J., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Kozielski J. Transmission of tuberculosis among people living in the border areas of Poland, the Czech Republic, and Slovakia. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2016, vol. 126, pp. 32–40.
12. Krüüner A., Hoffner S.E., Sillastu H., Danilovits M., Levina K., Svensson S.B., Ghebremichael S., Koivula T., Källenius G. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, pp. 3339–3345.
13. Marttila H.J., Soini H., Eerola E., Vyshnevskaya E., Vyshnevskiy B.I., Otten T.F., Vasilyef A.V., Viljanen M.K. A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol. 42, no. 9, pp. 2443–2445.
14. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 2, pp. 342–360.
15. Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, suppl. 1, pp. 167–76.
16. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W., Gomes L., Suffys P., Shen A.D., Vishnevskiy B. Russian «successful» clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 11, pp. 3757–3759.

17. Mokrousov I., Otten T., Zozio T., Turkin E., Nazemtseva V., Sheremet A., Vishnevsky B., Narvskaya O., Rastogi N. At Baltic crossroads: a molecular snapshot of Mycobacterium tuberculosis population diversity in Kaliningrad, Russia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 55, no. 1, pp. 13–22.
18. Mokrousov I., Vyazovaya A., Otten T., Zhuravlev V., Pavlova E., Tarashkevich L., Krishevich V., Vishnevsky B., Narvskaya O. Mycobacterium tuberculosis population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 7:e41318. doi: 10.1371/journal.pone.0041318
19. Mokrousov I., Vyazovaya A., Zhuravlev V., Otten T., Millet J., Jiao W.W., Shen A.D., Rastogi N., Vishnevsky B., Narvskaya O. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 5, pp. 1691–1693.
20. Narvskaya O., Mokrousov I., Otten T., Vishnevsky B. Molecular markers: application for studies of Mycobacterium tuberculosis population in Russia. Trends in DNA Fingerprinting Research. Ed. Read M.M. *New York: Nova Science Publishers 2005*, pp. 111–125.
21. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Grashchenkova O., Steklova L., Nikonova A., Filipenko M., Mokrousov I., Vyshnevskiy B. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002, vol. 21, pp. 596–602.
22. Nikolayevskiy V.V., Brown T.J., Bazhora Y.I., Asmolov A.A., Balabanova Y.M., Drobniewski F.A. Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from the southern Ukraine. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, vol. 13, no. 2, pp. 129–138.
23. Portaels F., Rigouts L., Bastian I. Addressing multidrug-resistant tuberculosis in penitentiary hospitals and in the general population of the former Soviet Union. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1999, vol. 3, pp. 582–588.
24. Smit P.W., Haanperä M., Rantala P., Couvin D., Lyytikäinen O., Rastogi N., Ruutu P., Soini H. Molecular epidemiology of tuberculosis in Finland, 2008–2011. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12:e85027. doi: 10.1371/journal.pone.0085027
25. Toit K., Altraja A., Acosta C.D., Viiklepp P., Kremer K., Kummik T., Danilovits M., Van den Bergh R., Harries A.D., Supply P. A four-year nationwide molecular epidemiological study in Estonia: risk factors for tuberculosis transmission. *Public Health Action*, 2014, vol. 21, no. 4, suppl. 2, pp. 34–40.
26. Tracevska T., Jansone I., Baumanis V., Marga O., Lillebaek T. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2003, vol. 7, pp. 1097–1103.
27. Van Embden J., Cave M., Crawford J., Dale J., Eisenach K., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T., Small P. Strain identification on Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, no. 31, pp. 406–409.
28. Zalutskaya A., Wijkander M., Jureen P., Skrahina A., Hoffner S. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis caused by the Beijing genotype and a specific T1 genotype clone (SIT No. 266) is widely transmitted in Minsk. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 194–198.

Авторы:

Вязовая А.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Ахмедова Г.М., к.м.н., зав. бактериологической лабораторией ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер Калининградской области», г. Калининград, Россия;

Соловьева Н.С., к.м.н., зав. бактериологической лабораторией НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

Герасимова А.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Старкова Д.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Туркин Е.Н., главный врач ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер Калининградской области», г. Калининград, Россия;

Журавлев В.Ю., к.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

Нарвская О.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; научный консультант отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

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

Authors:

Vyazovaya A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Akhmedova G.M., PhD (Medicine), Head of the Bacteriological Laboratory, Tuberculosis Dispensary of the Kaliningrad region, Kaliningrad, Russian Federation;

Solovieva N.S., PhD (Medicine), Head of the Bacteriological Laboratory, Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Gerashimova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Starkova D.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Turkin E.N., Head Physician, Tuberculosis Dispensary of the Kaliningrad region, Kaliningrad, Russian Federation;

Zhuravlev V.Yu., PhD (Medicine), Head of Department of the Laboratory Diagnostics, Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Narvskaya O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Scientific Advisor, Department of Laboratory Diagnostics, Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

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

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INTESTINE MICROBIOME OF REPUBLIC OF GUINEA AND RUSSIAN FEDERATION RESIDENTS

A.Yu. Popova^a, L.A. Kaftyreva^b, L.V. Suzhaeva^b, E.V. Voitenkova^b, A.V. Zabrovskaja^b,
S.A. Egorova^b, M.A. Makarova^b, Z.N. Matveeva^b, E.V. Zueva^b, A.A. Porin^b, M.Y. Boiro^c,
O.K. Konstantinov^c, Areg A. Totolian^b

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

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

^c Research Institute for Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

Abstract. The gut microbiota of healthy people, living in different regions, may vary considerably. The article presents the results of comparative qualitative and quantitative study of the intestine aerobic and anaerobic microbiota of residents of the Republic of Guinea (46) and Russia (60). The content of microorganisms (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp., non-fermentative gram-negative bacteria and others) in 1.0 gram of faeces was determined by bacteriological methods. Generic and species identification was performed using Vitek 2 Compact (bioMérieux, France), tube biochemical tests and MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Germany). Pearson χ^2 criterion, $p < 0.05$ and Fisher's exact test (medstatistica.ru) were used to assess the differences in the compared groups. 95% confidence intervals were calculated by the method of Wilson. Microbiological disorders were characterized by a decrease in the number of obligate microorganisms, an increase in the number of facultative (opportunistic) microorganisms (above 10^6 CFU/g) and the emergence of their associations. Dysbiotic disorders were identified in both compared groups: in 100% patients from Republic of Guinea (95% CI:92.3–100) and in 86.7% patients from St. Petersburg (95% CI:75.8–93.1). Severe degree of microbiota disorders in the residents of the Republic of Guinea was revealed at 19.6% (95% CI:10.7–33.2), in group of residents of St. Petersburg in 9.6% (95% CI:4.2–20.6). In both groups the microbiota disorders of third degree were detected less frequently, compared with the microbiota disorders of second degree. The study has found no significant differences in the content of obligate bacteria (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.), however, significant differences in the species composition of the facultative part of the microbiota were revealed. The residents of the Republic of Guinea had "atypical" *E. coli* (lactosonegative and hemolytic) and non-fermenting gram-negative bacteria *Comamonas kerstersii* more frequently. Opportunistic microorganism associations have been found in 30.4% of the residents of the Republic of Guinea (95% CI:19.1–44.8) and 18.3% of residents of St. Petersburg (95% CI:10.6–29.9). Opportunistic microorganism associations from the residents of the Republic of Guinea always contained *Staphylococcus aureus*. It is necessary to conduct further research on a bigger population to access the differences in the compared groups in *Staphylococcus aureus* and *Hafnia alvei*.

Key words: intestine microbiome, Republic of Guinea, *Enterobacteriaceae*, *Hafnia alvei*, *Comamonas kerstersii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.

Адрес для переписки:

Кафтырева Лидия Алексеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-48-83 (служебн.).
E-mail: kaflidia@mail.ru

Contacts:

Lidiia A. Kaftyreva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-48-83 (office).
E-mail: kaflidia@mail.ru

Библиографическое описание:

Попова А.Ю., Кафтырева Л.А., Сузаева Л.В., Войтенкова Е.В.,
Забровская А.В., Егорова С.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н.,
Зуева Е.В., Порин А.А., Буаро М.Й., Константинов О.К., Тотолян Арег А.
Сравнительная характеристика особенностей микробиоты кишечника
жителей Гвинейской Республики и России // Инфекция и иммунитет.
2017. Т. 7, № 4. С. 375–382. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-375-382

Citation:

Popova A.Yu., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Voitenkova E.V.,
Zabrovskaja A.V., Egorova S.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Zueva E.V.,
Porin A.A., Boiro M.Y., Konstantinov O.K., Totolian Areg A. Comparative
characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian
Federation residents // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 375–382. doi: 10.15789/2220-7619-2017-
4-375-382

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ И РОССИИ

А.Ю. Попова¹, Л.А. Кафтырева², Л.В. Сужаева², Е.В. Войтенкова², А.В. Забровская², С.А. Егорова², М.А. Макарова², З.Н. Матвеева², Е.В. Зуева², А.А. Порин², М.И. Буаро³, О.К. Константинов³, Арег А. Тотолян²

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

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

³ НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика

Резюме. Известно, что микробиота кишечника у клинически здоровых людей, проживающих в разных регионах, может значительно различаться. Цель исследования — сравнительное изучение качественного и количественного состава аэробной и анаэробной микробиоты кишечника на случайной малой выборке проб испражнений жителей Гвинейской Республики (46 человек) и России (60 человек). Содержание микроорганизмов (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., дрожжеподобные грибы рода *Candida*, неферментирующие грамотрицательные бактерии и др.) в 1,0 грамме фекалий определяли бактериологическим методом. Родовую и видовую идентификацию проводили с использованием бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (bioMerieux, Франция), рутинных биохимических тестов, а также MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bruker Daltonics, Германия). Для оценки различий результатов в сравниваемых группах применяли критерий χ^2 Пирсона, $p < 0,05$ и точный критерий Фишера, вычисленные с использованием он-лайн калькулятора medstatistica.ru. 95% доверительные интервалы рассчитывали по методу Уилсона. Микробиологические нарушения характеризовались снижением количества облигатных, повышением количества факультативных (условно-патогенных) микроорганизмов (в количестве 10^6 и выше КОЕ/г) и появлением их ассоциаций. Дисбиотические нарушения были выявлены в обеих сравниваемых группах: у 100% обследованных из Гвинейской Республики (95% ДИ:92,3–100) и у 86,7% обследованных из Санкт-Петербурга (95% ДИ:75,8–93,1). Выраженная степень нарушений микробиоциноза в группе жителей Гвинейской Республики встречалась в 19,6% (95% ДИ:10,7–33,2), в группе жителей Санкт-Петербурга в 9,6% (95% ДИ:4,2–20,6). Как у жителей Гвинейской Республики, так и у жителей Санкт-Петербурга нарушения третьей степени выявлялись реже, по сравнению с нарушениями второй степени. Исследование не выявило значимых различий в содержании облигатных бактерий (*Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.), однако, выявлены достоверные различия в видовом составе факультативной части микробиоты. У жителей Гвинейской Республики чаще обнаруживали «атипичные» *Escherichia coli* (гемолитические и лактозонегативные) и неферментирующие грамотрицательные бактерии *Comamonas kerstersii*. Ассоциации условно-патогенных микроорганизмов в разных по составу сочетаниях обнаружены в составе микробиоты у 30,4% обследованных жителей Гвинейской Республики (95% ДИ:19,1–44,8) и у 18,3% жителей Санкт-Петербурга (95% ДИ:10,6–29,9). Ассоциации микроорганизмов у жителей Гвинейской Республики всегда содержали *Staphylococcus aureus*. Выявлены отличия в сравниваемых группах в отношении *Staphylococcus aureus* и *Hafnia alvei*, однако необходимо проведение дальнейших исследований на большей выборке.

Ключевые слова: микробиота кишечника, Гвинейская Республика, *Enterobacteriaceae*, *Hafnia alvei*, *Comamonas kerstersii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.

Introduction

At present, the importance of bacteria for life, normal development and full functioning of the human body is beyond doubt. It has been proved by numerous studies of both Russian and foreign authors [2, 3, 10, 17, 19]. In the gastrointestinal tract (GIT) of a healthy person, as a result of a long joint evolution, a complex multicomponent ecological system that contains a large number of various types of bacteria and is called a “microbiome” was formed [2]. Its functional state, species composition, quantitative characteristics are influenced by various biotic and abiotic factors: climatic, ecological, social, etc. Being an open system, a microbiome, on the one hand, has a certain stability, and on the other hand it is capable of changing under the influence of the above factors [7, 12]. The adaptive possibilities of microbiome depend not only on external influences, but also are

closely related to the individual genetic characteristics of the macroorganism, the state of its immune system. At present, it has been shown that disruption of the well-functioning of intestinal microbiocenosis plays a leading role in the emergence and development of many pathological processes, both infectious and non-infectious [1, 9, 10, 23, 27].

The composition of the intestinal microbiome is formed from the first days of a newborn's life, varies depending on the age and nature of nutrition [1, 4]. As the development of age processes in humans, the composition of microorganism associations in the intestine changes (the content of *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., etc. decreases) [8].

Dysbiosis, the quantitative and qualitative disturbance of homeostasis of the intestinal microbiome, as already mentioned above, plays an important role in the pathogenesis of various diseases [13]. In this case, the dysbiotic states, depending on the degree

of disturbances in the composition of the microbiome, and the intensity and duration of the reasons that cause them, can either disappear due to the inclusion of compensatory mechanisms, or grow to a pathological stage requiring specific therapy.

A lot of work has been devoted to the study of the microbiome of the intestine, both in children and in adults. Thanks to the research conducted within the framework of the Human Microbiome Project, the participants were able to compile a comprehensive understanding of the diversity of microorganisms inhabiting the biotopes of the human body. The results of genetic analysis showed that in the human body there are over 10 thousand species of various microorganisms, and the most colonized organ is the intestine: the number of bacteria varies from $10-10^3$ cells in 1.0 gram in the small intestine to 10^{12} in the large intestine [5].

It is noted that the microbiome of the intestine in clinically healthy people living in different regions and countries can vary significantly. For example, the distinctive features of the microbiome of children living in Mongolia, whose diet was dominated by meat products, was an excessive amount of *Clostridium* spp. against a pronounced deficiency of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and other anaerobic non-spore-forming bacteria. In children who lived in Russia and were on a mixed diet, the intestinal microbiome also showed a deficiency of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. However, in general, the content of these microorganisms was significantly higher than that of children living in Mongolia. At the same time, various species of *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., yeast-like fungi of the *Candida* genus were present in abundant quantities in children living in Russia. One third of the children living in Switzerland had an increase in *Enterobacteriaceae*, and 16.7% had no *Enterococcus* spp. and in 50% had a reduced amount of *Bifidobacterium* spp. [7].

In a study of healthy residents of Vietnam and Russia, it was found that Vietnamese residents' fecal samples contained more *Enterobacteriaceae* and less *Lactobacillus* spp. than Russians, apart from the differences in the species belonging to *Enterococcus* spp. [6]. The residents of Uganda, Japan, India had a lower

number of bacteroides than those living in Europe and America [21]. The peculiarities of microbiome in the residents of the highland and lowland regions of China, various regions of India, Indonesia, Japan, Mongolia and Hong Kong have been revealed [16, 18, 24, 25, 27].

The aim of the study was to carry out a comparative study of the qualitative and quantitative composition of the aerobic and anaerobic microbiome of the intestine in a random batch of feces samples from the residents of the Republic of Guinea (Conakry) and Russia (St. Petersburg).

Materials and methods

Laboratory studies were conducted in the laboratory of enteric infections of the St. Petersburg Pasteur Institute. 106 samples of feces were obtained from 46 residents of the Republic of Guinea (Conakry) aged 24–64 and from 60 residents of St. Petersburg aged 19–63. The qualitative and quantitative composition of microbial communities of the intestine was determined in the autumn-winter periods (December 2015, October 2016). The persons were clinically healthy and did not have a history of somatic and infectious diseases of the digestive tract during the 12 months preceding the study. A survey of food characteristics showed that the diet of the surveyed group of residents of the Republic of Guinea included a large number of local vegetables, fruits, cereals and a limited number of meat and, especially, natural dairy products. The surveyed group of residents of St. Petersburg followed a typical diet for our country with sufficient consumption of meat, dairy and plant products.

The content of microorganisms (bacteria of the *Enterobacteriaceae* family, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., yeast-like fungi of the *Candida* genus, non-fermenting gram-negative bacteria, etc.) in 1.0 gram of feces was determined by the bacteriological method. Russian selective and differential-diagnostic nutrient media were used to isolate and identify bacteria, according to the current regulatory documents. Generic and species identification was carried out using a bacteriological analyzer Vitek 2 Compact, routine bio-

Table 1. The degree of microbiota disorders of the gastrointestinal tract in the residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg

Comparable groups	Number of samples, in which abnormalities were detected		Degree of severity of microbiota disorders		
			1	2	3
Residents of St. Petersburg	52	abs.	17	30	5
		%	32.7	57.7	9.6
		95%CI	21.5–46.2	44.2–70.1	4.2–20.6
Residents of Guinea	46	abs.	9	28	9
		%	19.6	60.8	19.6
		95%CI	10.7–33.2	46.5–73.6	10.7–33.2
The value of χ^2 ($d_f = 1$)			2.158	0.102	1.973
Level of significance (P)			> 0.05	> 0.05	> 0.05

Table 2. Contents of obligatory and facultative microorganisms in fecal samples of residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg

Comparable groups	Number of samples	Number of samples									
		Obligatory microorganisms corresponding to the norm					Facultative microorganisms exceeding the norm				
		<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	Typical <i>E. coli</i>	Atypical <i>E. coli</i>	<i>Clostridium</i> spp.	Opportunistic pathogen enterobacteria	<i>S. aureus</i>	<i>Candida</i> spp.	
Residents of St. Petersburg	abs.	50	43	49	39	10	15	21	10	9	
	%	83.3	71.6	81.6	65.0	16.7	25	35.0	16.7	15.0	
Residents of the Republic of Guinea	95% CI	72.0–90.7	59.2–81.5	70.1–89.4	52.4–75.8	9.3–28.0	15.8–37.2	24.2–47.6	9.3–28.0	8.1–26.1	
	abs.	31	37	26	28	20	9	27	16	7	
The value of χ^2 ($d_1 = 1$)	%	67.4	80.4	56.5	60.8	43.5	19.6	58.7	34.8	15.2	
	95% CI	53.0–79.1	66.8–89.3	42.2–69.8	46.5–73.6	30.2–57.8	10.7–33.2	44.3–71.7	22.7–49.2	7.6–28.2	
Level of significance (P)		3.672	1.081	7.956	0.191	9.224	0.439	5.9	4.616	0.001	
		> 0.05	> 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05	

chemical tests, and MALDI-TOF mass spectrometry. For MALDI-TOF mass spectrometry, the bacterial cells from isolated colonies grown on differential diagnostic solid media for 18–24 hours of incubation were applied in a thin layer on the MALDI target wells, followed by lamination of 1 µl of the matrix, which is a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics, Germany) in an aqueous solution of 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich). Spectra of the samples were obtained in the linear positive mode of operation of the MALDI-TOF mass spectrometer “Microflex LRF” (Bruker Daltonics, Germany) using the “FlexControl” 3.3 software (Bruker Daltonics, Germany). Prior to measurement, the instrument was calibrated using a bacterial test standard (Bruker Daltonics, Germany). The spectral profiles of the samples were the sum of ions obtained from 240 laser flares at different locations in each MALDI target well, performed automatically in the mass/charge range (m/c) from 2000 to 20 000 Da. Identification of the microorganisms was carried out using the “MALDI Biotyper RTC” software (Bruker Daltonics, Germany) by comparing the mass spectra of each test sample with the reference spectra data from the taxonomic base and calculating the coincidence coefficients represented as scores.

The degrees of microbiological disturbances were assessed according to the Industry Standard OST No. 91500.11.004–2003 “Protocol of patient management. Dysbacteriosis of the Intestine”, Federal Clinical Recommendations “Determination of Dysbiotic Changes in the Gastrointestinal Tract by Markers of the Intestinal Content”, 2015. In order to evaluate the differences in the results in the compared groups, the χ^2 Pearson criterion, $p < 0.05$ and Fisher’s exact test, calculated using the on-line calculator medstatistica.ru, were used. 95% confidence intervals were calculated using the Wilson method.

Findings

According to OST No. 91500.11.004–2003 and FCG (Federal clinical guidelines) of 2015, the degree of microbiological disturbances is characterized by a decrease in the number of obligatory ones, an increase in the number of facultative (opportunistic pathogens) microorganisms (OPM) and the appearance of their associations. Using these criteria, dysbiotic disorders were detected in both compared groups: 100% (95% CI: 92.3–100) surveyed from the Republic of Guinea and 86.7% (95% CI: 75.8–93.1) surveyed from St. Petersburg (Table 1).

Minor deviations from the norm (the first degree of microbiological disorders) occurred in the group of St. Petersburg residents in 32.7% (95% CI: 21.5–46.2), in the group of residents of the Republic of Guinea in 19.6% (95% CI: 10.7–33.2). The changes revealed were characterized by a decrease in the amount of *Bifidobacterium* spp. (up to 10^8 – 10^7 CFU/g), *Lactobacillus* spp. (up to 10^6 CFU/g), “typical” *Escherichia coli* (up to 10^6 CFU/g).

Microbiota disorders corresponding to the second degree occurred in 60.8% (95% CI: 46.5–73.6) in the group of surveyed residents of the Republic of Guinea and in 57.7% (95% CI: 44.2–70.1) of the surveyed residents of St. Petersburg. Deviations from the norm were characterized by a decrease in the content of *Bifidobacterium* spp. (up to 10^7 CFU/g) and *Lactobacillus* spp. (up to 10^5 CFU/g), an imbalance in the quantitative and qualitative composition of *Escherichia coli* (the presence of “atypical” strains with hemolytic activity and not able to ferment lactose), as well as the appearance in the microbiome of OPM and their associations in an amount exceeding 10^5 CFU/g.

The third degree of microbiota disorders in the group of residents of the Republic of Guinea was found in 19.6% (95% CI: 10.7–33.2), in the St. Petersburg group in 9.6% (95% CI: 4.2–20.6).

The disorders were characterized by a pronounced decrease in the number of obligate bacteria (*Bifidobacterium* spp. — less than 10^7 CFU/g, *Lactobacillus* spp. — less than 10^5 CFU/g), an increase in the content of OPM and their associations in an amount of 10^6 CFU/g and higher. When comparing the prevalence of each of the three degrees of microbiota disorders between the population of the Republic of Guinea and the population of St. Petersburg, no differences were found, however, statistically significant differences in the distribution of the proportion of microbiota disorders of various degrees were found within each population. Second degree disorders prevailed in the residents of the Republic of Guinea, the differences between the prevalence of disorders of the first and third degrees were not identified. In St. Petersburg residents, the prevalence of microbiota disorders of the third degree is significantly lower than the first and second degree, however, there is no difference between the prevalence of disorders of the first and second degree. At the same time, both in the residents of the Republic of Guinea and in St. Petersburg resi-

dents, the proportion of disorders of the third degree is significantly lower than the second degree.

Associations of OPM in different combinations were found in microbiome in 30.4% of the surveyed residents of the Republic of Guinea (95% CI: 19.1–44.8) and 18.3% of St. Petersburg residents (95% CI: 10.6–29.9). At the same time, OPM associations in the surveyed residents of the Republic of Guinea always contained *Staphylococcus aureus*.

Table 2 represents data on the number of samples corresponding to norm for the content of obligatory and facultative microorganisms, significant for determining the severity of dysbiotic conditions. In the compared groups, the proportion of samples corresponding to norm by the number of *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. and “typical” *Escherichia coli*, did not differ statistically significantly.

Statistically significant differences were detected in the number of samples corresponding to the norm for the content of *Enterococcus* spp.: in St. Petersburg residents — 81.6% (95% CI: 70.1–89.4), in the Republic of Guinea residents — 56.5% (95% CI: 42.2–69.8). Species composition of *Enterococcus* spp. was identical in both groups. Proportions of *E. faecium* and *E. faecalis* were practically the same and amounted to 38.7% and 32.3%, respectively in the group of residents of St. Petersburg and 38.9% and 33.3% in the group of residents of the Republic of Guinea. In both groups there were isolated findings of other species (*E. avium*, *E. durans*, *E. galinarum*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*).

Analysis of the content of facultative microorganisms revealed statistically significant differences in relation to some bacteria. In the group of surveyed residents of the Republic of Guinea, samples with “atypical” (hemolytic and lactose-negative) *Escherichia coli* exceeding the norm were more common: 43.5% (95% CI: 30.2–57.8) compared to 16.7% (95% CI: 9.3–28.0) in the group of residents of St. Petersburg. The nonfermentative gram-negative bacteria *Comamonas kerster-*

Table 3. The frequency of opportunistic pathogens detection in the feces of the residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg

Comparable groups of residents:	Total samples	Number of samples containing opportunistic pathogens								
		<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.	<i>H. alvei</i>	<i>Comamonas kerstersii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Candida</i> spp.	
St. Petersburg	60	abs.	12	3	5	0	1	1	10	9
		%	20.0	5.0	8.3	0	1.7	1.7	16.7	15.0
		95% CI	11.8–31.8	1.7–13.7	3.6–18.1	0.0–6.0	0.3–8.9	0.3–8.9	9.3–28.0	8.1–26.1
The Republic of Guinea	46	abs.	12	4	4	1	6	8	16	7
		%	26.1	8.7	8.7	2.2	13.0	17.4	34.8	15.2
		95% CI	15.6–40.3	3.4–20.3	3.4–20.3	0.4–11.3	6.1–25.7	9.1–30.7	22.7–49.2	7.6–28.2
Fisher's exact test			0.48992	0.46430	1.00	0.43396	0.04111	0.0096	0.04096	1.00

sii were detected in 17.4% (95% CI: 9.1–30.7) of residents from the Guinean Republic and 1.7% (95% CI: 0.3–8.9) of residents from St. Petersburg (Table 3).

There were no statistically significant differences in the prevalence of facultative opportunistic pathogenic *Enterobacteria* among residents of St. Petersburg and the Republic of Guinea: *Klebsiella* spp. — 20.0% (95% CI: 11.8–31.8) and 26.1% (95% CI: 15.6–40.3), *Citrobacterspp.* — 5.0% (95% CI: 1.7–13.7) and 8.7% (95% CI: 3.4–20.3), *Enterobacter* spp. — 8.3% (95% CI: 3.6–18.1) and 8.7% (95% CI: 3.4–20.3), *Proteus* spp. — 0% (95% CI: 0.0–6.0) and 2.2% (95% CI: 0.4–11.3), *Clostridium* spp. — 25.0% (95% CI: 15.8–37.2) and 19.6% (95% CI: 10.7–33.2), *Candida* spp. — 15.0% (95% CI: 8.1–26.1) and 15.2% (95% CI: 7.6–28.2), respectively.

It was found that *Staphylococcus aureus* and *Hafnia alvei* were more common in the group of residents of the Republic of Guinea, but when the results were projected for the population, the differences were statistically insignificant: *Staphylococcus aureus* 34.8% (95% CI: 22.7–49.2) and 16.7% (95% CI: 9.3–28.0); *Hafnia alvei* — 13.0% (95% CI: 6.1–25.7) and 1.7% (95% CI: 0.3–8.9).

Discussion

The human society is constantly confronted with various new problems, despite progress in many areas of medical science and health. One of such problems at present is the violation of the microbial balance of the gastrointestinal tract, leading to the dysbiotic states of the human body. Analysis of the microbiome of the gastrointestinal tract in healthy people living in different regions of the world, presented in the works of many researchers, have shown significant variations in its quantitative and qualitative composition [11, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 24, 25, 26, 27].

The results of our pilot project showed that in compared groups of practically healthy people in St. Petersburg, who had a relatively balanced diet with a predominance of animal proteins, and residents of the Republic of Guinea, who had a predominant prevalence of vegetables and cereals in the diet, significant differences in the content of obligate bacteria (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.), responsible for colonization resistance (one of the most important factors of the anti-infection protection system), have not been identified. According to our data, the prevalence of microbiota disorders of varying severity was noted with equal frequency among residents of the

Republic of Guinea and among residents of St. Petersburg. Moreover, within each population, statistically significant differences in the distribution of the proportion of microbiota disorders of various degrees were found. Both in the residents of the Republic of Guinea and the residents of St. Petersburg, the proportion of disorders of the third degree was detected less frequently, compared with the proportion of disorders of the second degree.

Reliable differences in the species composition of the facultative part of the microbiome are revealed. “Atypical” *Escherichia coli* (hemolytic and lactose-negative) and non-fermenting gram-negative bacteria *Comamonas kerstersii* are more often found in the residents of the Republic of Guinea.

We obtained differences in the compared groups for *Staphylococcus aureus* and *Hafnia alvei* (Fisher’s exact test of 0.04096 and 0.04111, respectively), however, when projecting the results to population, the differences were statistically insignificant, further research on a larger population is necessary. It should be noted that these bacteria belong to the OPM and sanitary indicator microorganisms. Under certain conditions, any OPM can cause human diseases, especially in people with weakened immunity (purulent-septic infections, food poisoning, etc.) On the other hand, the presence of these bacteria in the digestive tract may reflect the characteristics of the macroorganism’s habitat. This is confirmed by the example of our data on the content of *Comamonas kerstersii* in the digestive tract in a group of surveyed residents of the Republic of Guinea. For these microorganisms, the ecological niche is the environment: according to the literature sources, strains of *Comamonas* spp. were often identified in the study of samples of swampy soil and water environment, washings from fruit and vegetables, plankton, termites gut, etc. *Comamonas kerstersii* is often present in microbial communities associated with natural biocenoses and biodegradation processes [28]. More frequent findings of *Comamonas kerstersii* and “atypical” *Escherichia coli* characterize the microbiome of the gastrointestinal tract of the residents of the Republic of Guinea. It can be assumed that this is due to the humid tropical climate, low socio-economic level, and also the predominance of local vegetables and fruits in the diet.

Acknowledgements

The authors are grateful to Marina Sofronova for her advice in writing the article.

Список литературы/References

1. Бондаренко В.М., Малеев В.В., Лиходед В.Г. Кишечная микрофлора, ожирение и диабет 2 типа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 42–49. [Bondarenko V.M., Maleev V.V., Likhoded V.G. Intestinal microflora, obesity and type 2 diabetes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 3, pp. 42–49. (In Russ.)]
2. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. Анализ профилактического и лечебного действия пробиотических препаратов с позиций новых научных технологий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 2. С. 90–104. [Bondarenko V.M., Rybalchenko O.V. Analysis of prophylactic and therapeutic effect of probiotic preparations from position of new scientific technologies. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 2, pp. 90–104. (In Russ.)]

3. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2015. № 4. С. 4–9. [Bukharin O.V. Infectious symbiology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 4, pp. 4–9. (In Russ.)]
4. Денисова С.Н., Тарасова О.В., Ильенко Л.И., Сенцова Т.Б., Богданова С.В., Ревякина В.А., Белицкая М.Ю. Биохимические маркеры в оценке функционального состояния кишечной микрофлоры у детей на искусственном вскармливании // Педиатрия. 2016. Т. 95, № 3. С. 109–117. [Denisova S.N., Tarasova O.V., Ilenko L.I., Sentsova T.B., Bogdanova S.V., Revyakina V.A., Belitskaya M.Yu. Biochemical markers in assessment of intestinal microflora functional state in formula-fed infants. *Pediatriya = Pediatrics*, 2016, vol. 95, no. 3, pp. 109–117. (In Russ.)]
5. Домотенко Л.В., Шепелин А.П., Морозова Т.П. Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника // Бактериология. 2016. Т. 1, № 1. С. 48–53. [Domotenko L.V., Shepelin A.P., Morozova T.P. Nutrient media for the main representatives of intestinal normal flora. *Bakteriologiya = Bacteriology*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 48–53. (In Russ.)]
6. Ермоленко Е. И., Котылева М. П., Буй Тхи Лан Ань, Чан Тхи Ньай, Буй Тхи Тхань Нга, Нго Тхань Нам, Краева Л.А., Гончаров А.Е., Карасева А.Б., Киреева А.Г., Суворов А.Н. Исследования микробиоты жителей Вьетнама и России // J. Trop. Sci. Tech. 2016. Т. 11. С. 24–35. [Ermolenko E.I., Kotyleva M.P., Bui Thi Lan An, Chan Thi Nyai, Bui Thi Thanh Nga, Ngo Thanh Nam, Krayeva L.A., Goncharov A.E., Karaseva A.B., Kireeva A.G., Suvorov A.N. Studies of microbiome in Vietnam and Russia. *J. Trop. Sci. Tech.*, 2016, vol. 11; pp. 24–35.]
7. Коршунов В.М., Поташник Л.В., Ефимов Б.А., Володин Н.Н., Коршунова О.В., Гуг К., Frei R., Reber H., Иэрэндорж Д. Микрофлора кишечника у детей Монголии, России и Швейцарии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2001. № 2. С. 61–64. [Korshunov V.M., Potashnik L.V., Efimov B.A., Volodin N.N., Korshunova O.V., Gyg K., Frei R., Reber H., Ierandorg D. Intestinal microflora in children in Mongolia, Russia and Switzerland. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2001, no. 2, pp. 61–64. (In Russ.)]
8. Коршунов В.М., Поташник Л.В., Ефимов Б.А., Коршунова О.В., Смянов В.В., Гуг К., Frei R. Качественный состав нормальной микрофлоры кишечника у лиц различных возрастных групп // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2001. № 2. С. 57–61. [Korshunov V.M., Potashnik L.V., Efimov B.A., Korshunova O.V., Smeyanov V.V., Gyg K., Frei R. Qualitative composition of normal intestinal microflora in persons of different age groups. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2001, no. 2, pp. 57–61. (In Russ.)]
9. Костюкевич О.И. Влияние кишечной микрофлоры на здоровье человека. От патогенеза к современным методам коррекции дисбиоза // Российский медицинский журнал. 2011. № 5. С. 304. [Kostyukevich O.I. Influence of intestinal microflora on human health. From pathogenesis to modern methods of dysbiosis correction. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2011, no. 5, p. 304. (In Russ.)]
10. Максимова О.В., Гervазиева В.Б., Зверев В.В. Микробиота кишечника и аллергические заболевания // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2014. № 3. С. 49–60. [Maksimova O.V., Gervazieva V.B., Zverev V.V. Intestine microbiota and allergic diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 3, pp. 49–60. (In Russ.)]
11. Нисевич Н.И., Гаспарян М.О., Новокшенов А.А. К вопросу о дисбактериозе кишечника детей // Педиатрия. 1999. № 1. С. 98–102. [Nisevich N.I., Gasparyan M.O., Novokshonov A.A. Problem of pediatric intestinal dysbiosis. *Pediatriya = Pediatrics*, 1999, no. 1, pp. 98–102. (In Russ.)]
12. Нормофлора и дисбактериозы человека. Под ред. А.Л. Котовой. Алматы: ТОО «Люкс Биндер Сервис», 2008. С. 254–255. [Normoflora i disbakteriozy cheloveka. Pod red. A.L. Kotovoi [Norm flora and human dysbiosis. Eds. Kotova A.L.]. *Almaty: TOO "Lux Binder Service"*, 2008, pp. 254–255. (In Russ.)]
13. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: отраслевой стандарт (ОСТ 91500.11.0004), приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003. М., 2003. 110 с. [Protokol vedeniya bol'nyh. Disbakterioz kishhechnika: otraslevoj standart (OST 91500.11.0004), prikaz MZ RF № 231 ot 09.06.2003. [Protocol of Patients Management. Dysbacteriosis of the Intestine: the Industry Standard (OST 91500.11.0004), order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 231 of 09.06.2003]. *Moscow, 2003, 110 p. URL: https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=62571 (13.09.2017)*
14. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника: федеральные клинические рекомендации. М., 2015. 35 с. [Opredelenie disbioticheskikh izmenenij zheludochno-kishechnogo trakta po markeram soderzhimogo kishhechnika: federal'nye klinicheskie rekomendacii. [Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal trace by markers of the intestinal content: federal clinical recommendations]. *Moscow, 2015. 35 p. URL: http://nasci.ru/_resources/directory/222/common/Opredelenie_disbioz.pdf (13.09.2017)*
15. Шептулин А.А. Синдром избыточного роста бактерий и дисбактериоз кишечника: их место в современной гастроэнтерологии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1999. № 3. С. 54–56. [Sheptulin A.A. Bacterial overgrowth syndrome and "intestinal dysbacteriosis": a place in modern gastroenterology. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 1999, no. 3, pp. 54–56. (In Russ.)]
16. Chatterjee B., Thakur S.S. Microbial profiling: extend ethnicity of human microbiome. *Nature*, 2012, vol. 487, p. 39. doi: 10.1038/487039d
17. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.T., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, vol. 505, pp. 559–563. doi: 10.1038/nature12820
18. Dehingia M., Thangjam K., Talukdar N.C., Talukdar R., Reddy N., Mande S.S., Deka M., Khan M.R. Gut bacterial diversity of the tribes of India and comparison with the worldwide data. *Sci. Rep.*, 2015, 5:18563. doi: 10.1038/srep18563
19. Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 2014, vol. 509, pp. 357–360. doi: 10.1038/nature13178
20. Faller R.J., LaMont J.T. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, 2002, vol. 31, no. 1, pp. 41–62.

21. Hill M., Grawther J., Drasar B. Bacteria and aetiology of cancer of the large bowel. *Lancet*, 1971, no. 7690, p. 95.
22. Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. How host – microbial interaction shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 2002, vol. 22, pp. 283–307. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259
23. Huycke M.M., Gaskins H.R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2004, vol. 229, pp. 586–597.
24. Kwok L.Y., Zhang J., Guo Z., Gesudu Q., Zheng Y., Qiao J., Huo D., Zhang H. Characterization of fecal microbiota across seven Chinese ethnic groups by quantitative polymerase chain reaction. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 4:e93631. doi: 10.1371/journal.pone.0093631
25. Li L., Zhao X. Comparative analyses of fecal microbiota in Tibetan and Chinese Han living at low or high altitude by barcoded 454 pyrosequencing. *Sci. Rep.*, 2015, no. 5:14682. doi: 10.1038/srep14682
26. Mitsuoka T. Intestinal flora and host. *Asian Med. J.*, 1988, vol. 31, no.7, pp. 400–409.
27. Nakayama J., Watanabe K., Jiang J., Matsuda K., Chao S.H., Haryono P., La-Ongkham O., Sarwoko M.A., Sujaya I.N., Zhao L., Chen K.T., Chen Y.P., Chiu H.H., Hidaka T., Huang N.X., Kiyohara C., Kurakawa T., Sakamoto N., Sonomoto K., Tashiro K., Tsuji H., Chen M.J., Leelavatcharamas V., Liao C.C., Nitisinprasert S., Rahayu E.S., Ren F.Z., Tsai Y.C., Lee Y.K. Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci. Rep.*, 2015, no.5. doi: 10.1038/srep08397
28. Opota O., Ney B., Zanttti G., Jatona K., Greuba G., Prod'hom G. Bacteremia caused by *Comamonas kerstersii* in a patient with diverticulosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 3, pp. 1009–1012. doi: 10.1128/jcm.02942-13

Авторы:

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

Кафтырева Л.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Сужаева Л.В., младший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Войтенкова Е.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Забровская А.В., к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Егорова С.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Макарова М.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Матвеева З.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Зуева Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Порин А.А., к.м.н., научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Буаро М.И., к.б.н., профессор, генеральный директор Института Пастера Гвинеи, г. Киндия, Гвинейская Республика;

Константинов О.К., к.б.н., научный сотрудник Института Пастера 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.

Authors:

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

Kaftyreva L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Suzhaeva L.V. Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Voitenkova E.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zabrovskaja A.V., PhD (Veterinary), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Egorova S.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Makarova M.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Matveeva Z.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zueva E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Porin A.A., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Boiro M.Y., PhD (Biology), Professor, General Director of Pasteur Institute of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Konstantinov O.K., PhD (Biology), Researcher, Pasteur Institute of 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.

RESULTS OF GENOTYPING HEPATITIS VIRUS B IN HBsAg-NEGATIVE BLOOD DONORS IN ASTANA, KAZAKHSTAN

Yu.V. Ostankova^a, A.V. Semenov^{a,b,c}, Z.K. Burkitbayev^d, T.N. Savchuk^d, Areg A. Totolian^{a,b}

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

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

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

^d Research and Production Center of Transfusiology, Astana, Kazakhstan

Abstract. The prevalence of HBV infection is estimated by the frequency of occurrence of HBsAg and varies depending on the geographic region. Chronic infection is characterized by a stable presence of HBsAg for 6 months, with the exception of the occult form of the disease, characterized by the absence of HBsAg, an extremely low level of HBV DNA in the blood serum. The problem of identifying occult HBV (ocHBV) is especially relevant because of the development of transplantology and transfusiology. However, serological screening of donor blood used in the Russian Federation and Central Asian countries does not reveal HBV seronegative donors. Since HBV infection is possible with the introduction of small doses of the virus, the importance of using complex molecular methods for detecting donor ocHBV is obvious, despite the low viral load, since donor blood is used predominantly in patients with severe course of various diseases characterized by increased susceptibility to HBV because of immunosuppression. The aim of our work was to study the characteristics of the genetic structure of the ocHBV in donors in Astana, Kazakhstan. A total of 500 blood plasma samples from HBsAg-negative donors were obtained in 2012 from residents of Kazakhstan, Astana. Using the method, we proposed to detect HBV DNA with a low viral load, HBV was detected in 9.4% of donors. Serological markers were found in 12.7% of patients with HBV DNA, 8.5% had HBcor IgG antibodies, 4.2% had HBcor IgG and HBe IgG antibodies at the same time. Thus, in 41 (87.3%) of the blood donor, ocHBV was seronegative. Based on the phylogenetic analysis of the 47 isolates showed that the HBV of genotype D (95.75%) prevails in the examined group in comparison with HBV of genotype A (4.25%). HBV subgenotypes are represented in the following ratios: D1 — 46.8%, D2 — 17.05%, D3 — 31.9%, A2 — 4.25%. In a comparative analysis, the distribution of HBV subgenotypes in the group with ocHBV and in the case of the manifest form in donors in the Republic of Kazakhstan significantly differed — $\chi^2 = 14.027$ at $p = 0.0072$, $d_f = 4$. The incidence of HBV D3 with ocHBV (31.9%) exceeded that of patients with a manifest form (7.4%). The relative risk of occult form of disease in patients with the subgenotype D3 is significantly higher (RR = 1.572, CI: 1.179–2.096, $p = 0.0208$). When assessing the picture of HBV diversity on the material of the group including HBsAg-negative and HBsAg-positive blood donors, it is evident that the genetic relationship of the manifestations of the manifest HBV and the ocHBV of genotype D is obvious. Among the isolates are both similar in nucleotide sequences with those previously described in various regions of Europe and Central Asia, and circulating in the territory of the Republic of Kazakhstan, which indicates an independent homologous evolution of HBV in the region. The high incidence of ocHBV among HBsAg-negative blood donors is indicative not only of the widespread prevalence of the occult form of the disease course in the population and the inadequacy for the detection of chronic HBV of conventional HBsAg and HBV DNA in the peripheral blood using commercial kits, but also the need to study the characteristics of the immune response with this form of the disease course.

Key words: hepatitis B, occult HBV, molecular epidemiology, DNA HBV.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотolian Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 383–392. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-383-392

Citation:

Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T.N., Totolian Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 383–392. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-383-392

РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В У HBsAg-НЕГАТИВНЫХ ДОНОРОВ КРОВИ В г. АСТАНА, КАЗАХСТАН

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

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

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

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

⁴ Научно-производственный центр трансфузиологии, Астана, Казахстан

Резюме. Распространенность ВГВ-инфекции оценивается по частоте встречаемости HBsAg и варьирует в зависимости от географического региона. Для хронической инфекции характерно устойчивое присутствие HBsAg в течение 6 месяцев за исключением оккультной формы течения заболевания, характеризующейся отсутствием HBsAg, крайне низким уровнем ДНК ВГВ в сыворотке крови. Проблема выявления оккультного ГВ (окГВ) особенно актуальна в связи с развитием трансплантологии и трансфузиологии. Однако использующийся в РФ и странах Средней Азии серологический скрининг донорской крови не выявляет ВГВ серонегативных доноров. Поскольку заражение ВГВ возможно при введении малых доз вируса, очевидна значимость использования сложных молекулярных методов для выявления окГВ у доноров, несмотря на низкую вирусную нагрузку, так как донорская кровь используется преимущественно у пациентов с тяжелым течением различных заболеваний, отличающихся повышенной восприимчивостью к ВГВ на фоне иммуносупрессии. Целью нашей работы было изучение особенностей генетической структуры окГВ у доноров крови в г. Астана, Казахстан. Обследовано 500 HBsAg-негативных образцов плазмы донорской крови, полученные в 2012 г. от жителей Казахстана, г. Астана. При использовании предложенного нами метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке ВГВ был выявлен у 9,4% доноров. Серологические маркеры обнаружены у 12,7% пациентов с выявленной ДНК ВГВ, при этом в 8,5% случаев обнаружены антитела HBsAg IgG, в 4,2% случаев антитела HBcAg IgG и HBe IgG одновременно. Таким образом, у 41 (87,3%) донора крови окГВ был в серонегативной форме. На основании филогенетического анализа 47 изолятов показано, что в обследованной группе преобладает ВГВ генотипа D (95,75%) по сравнению с ВГВ генотипа А (4,25%). Субгенотипы ВГВ представлены в следующих соотношениях: D1 — 46,8%, D2 — 17,05%, D3 — 31,9%, A2 — 4,25%. При сравнительном анализе распределение субгенотипов ВГВ в группе с окГВ и при манифестной форме у доноров в Республике Казахстан достоверно отличалось — $\chi^2 = 14,027$ при $p = 0,0072$, $d_f = 4$. Частота встречаемости ВГВ D3 при окГВ (31,9%) превышала таковую у пациентов с манифестной формой (7,4%). Относительный риск развития оккультной формы ХВГВ у пациентов с субгенотипом D3 достоверно выше (RR = 1,572, CI: 1,179–2,096, $p = 0,0208$). При оценке картины разнообразия ВГВ на материале группы, включающей HBsAg-негативных и HBsAg-положительных доноров крови становится очевидным близкое генетическое родство изолятов манифестного ХВГВ и окГВ генотипа D. Среди изолятов представлены как сходные по нуклеотидным последовательностям с ранее описанными в различных регионах Европы и Средней Азии, так и циркулирующие на территории Республики Казахстан, что свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе. Высокая встречаемость окГВ среди HBsAg-негативных доноров крови свидетельствует не только о широком распространении оккультной формы течения заболевания в популяции и недостаточности для выявления ХВГВ общепринятых анализов на HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови с использованием коммерческих наборов, но и говорит о необходимости изучения особенностей иммунного ответа при данной форме течения ХВГВ.

Ключевые слова: гепатит В, оккультный ВГВ, молекулярная эпидемиология, секвенирование.

Introduction

According to the World Health Organisation (WHO), in the world there are almost 2 billion people infected with the hepatitis B virus (HBV), more than 240 million develop chronic viral hepatitis B (CHBV) — a diffuse inflammatory disease associated with persistence of HBV [47]. Annually, 686 000 people die from hepatitis B infection, as well as from liver cirrhosis and cancer as a result of chronic infection complications [19]. The widespread prevalence of HBV remains a major global health problem.

The prevalence of HBV infection at this time is estimated by the frequency of occurrence of HBsAg and varies depending on the geographic region.

The prevalence is classified as high ($\geq 8\%$ of the population), medium (2–7% of the population) and low ($< 2\%$ of the population) [28]. In the Russian Federation, as well as in the territory of the former Soviet Union, the average incidence of HBV is about 5% [9].

Phylogenetic analysis of complete nucleotide sequences obtained from different regions of the world has made it possible to divide HBV into ten genotypes, designated as A–J genotypes, differing in the composition of nucleotide sequences by more than 8%; as well as by 35 subgenotypes (within the genotypes A, B, C, D, F, H), for which the discrepancy between complete nucleotide sequences makes 4–7.5% [11, 24, 25, 27, 31, 33, 48].

Studies of the prevalence of HBV genovariants in different regions of the world have been actively conducted since genotypes were discovered to the present. Genotypes are distributed geographically. This distribution varies very slowly over time, reflecting the ways in which the virus spreads due to human migration, as well as the peculiarities of the geographical origin of different genotypes. This allows to use HBV genovariants as epidemiological markers [24]. In most regions, with rare exception, the circulate genotypes make up 1 or 2 prevailing and several minor ones, including those imported from other territories [31]. The country prevailing HBV genotypes depend significantly on the migration of the population and the origin of immigrants. That is, the ways of spreading the virus in connection with population migration as well as its origin can be traced through the heterogeneity of genotypes distribution in various regions of the world.

Although, using an effective HBV vaccine in clinical practice has significantly reduced the circulation of the virus, there is a tendency observed in recent years — a shift of the prevalence of HBV genotypes in various geographic areas due to migration from countries with a high incidence of hepatotropic viruses. This forces physicians and epidemiologists to pay close attention to the epidemiological situation in neighboring countries [15]. This is especially relevant in the light of active migration processes involving the population of the Russian Federation and the countries of the Central Asian region, where the prevalence of HBV is high.

Chronic HBV infection occurs in 90% of children infected in the pre- and neonatal period, 25–50% of children infected at 1–5 years of age, 1–5% of people infected as older children and up to 10% got infected being adults [13, 21, 29, 41, 49].

The clinical manifestations of CHBV are diverse and depend mainly on the biological properties of the virus and its interaction with the host's immune system. However, the duration of the disease, the level of viral load and its changes over time, virus mutations, environmental and genetic factors, ethnicity and sex of the patient can influence the course of the disease [12]. Chronic infection is characterized by a stable presence of HBsAg for at least 6 months (with or without HBeAg concomitant), with the exception of the occult form of the disease characterized by the absence of HBsAg, an extremely low level of HBV DNA in the blood serum (< 200 IU of HBV DNA per ml) [39].

Due to the relatively recent discovery of this variant of CHBV, the risk factors associated with occult infection of CHBV are still not fully investigated and understood, although some data suggest that occult HB (OHB) retains most of the same risk factors as the symptomatic form of CHBV [36]. The problem of OHB has become especially important in connection with the development of transplantology and

transfusiology, as well as in connection with new data concerning the importance of HBV infection with low viral load (low dose infection was used as an analogue) for the development of instant seronegative OHB and a high risk of hepatocellular carcinoma [30].

Ensuring the infectious safety of blood transfusions during planned and urgent surgical operations is a topical medical problem and should be implemented first of all in order to prevent the transmission of viruses. Post-transfusion infection of HBV is a serious problem and is one of the significant risk factors for human infection. It is reported that the risk of HBV infection after transfusion is higher than that of other blood-borne viruses, such as HIV and HCV [22]. Including because in connection with the use of standard commercial kits, the OHB can later be detected in persons negative for all HBV markers [17].

At the heart of viral blood safety in transfusiology is the quality of donor selection and testing for markers of viral infections. For serological screening of donor blood in the Russian Federation, test systems are used to detect HBsAg, which, of course, cannot ensure the absolute detection of infected donors. The criteria and protocol adopted in the serological screening of blood donors in Russia and Central Asia significantly reduced the likelihood of HBV transmission. In an ideal situation, which the blood transfusion centers seek, in donors, especially in regular donors, there should be no infections. However, at present comparison of the incidence of infections in donors and in the population serves as a tool for assessing the quality of donor selection [1, 2]. Despite the introduction of universal vaccination and the development of sensitive and specific assays that in recent decades have reduced the risk of infection, HBV seronegative donors may still transmit the virus in the late phase of infection [38].

It is extremely important to determine the prevalence of OHB among healthy blood donors to assess the likelihood of transmission of HBV through blood transfusion, and then assess the need to improve and even modify donor pre-selection strategies to reduce the risk of transmission [18]. Therefore, molecular methods have been used for several years for the selection of a donor blood in the United States and a number of European countries. Since, as mentioned above, HBV infection is possible with the introduction of small doses of the virus, it is evident that the complex molecular methods for the detection of OHB in donors are very important, despite the extremely low viral load in these samples. When screening donors blood, this is especially important, since donor blood is used mainly in patients with severe course of various diseases characterized by increased susceptibility to HBV against immunosuppression. The importance of detecting OHB in the population and in blood donors was also shown in the study

of a specific immune response, where the severity of the Th1 response in patients with OHB was significantly higher than in patients with symptomatic CHBV in the phase of inactive HBV carrier [14, 50].

The purpose of this paper is to study the peculiarities of the genetic structure of OHB in blood donors in Astana, Kazakhstan.

Materials and methods

The work used 500 samples of donor blood plasma, obtained in 2012 from residents of Kazakhstan, Astana. A sample of blood from each donation was examined for the markers of four blood-borne infections: HIV (p24 HIV-1 antigen and anti-HIV-1/2 antibodies), HBV (HBV surface antigen, HBsAg), HCV (anti-HCV antibodies); syphilis (class M and G anti-*Treponema pallidum* antibodies).

Primary detection of HBV was carried out by isolating nucleic acids (NK) from the blood plasma using the «AmplePrime Ribo-prep» commercial kit (FBIS CRIE, Moscow). For all samples, preliminary concentration of virus particles was carried out by ultracentrifugation of blood plasma for 1 hour at 24 000g, +4°C. Analysis of the presence of the virus was carried out by polymerase chain reaction (PCR) with hybridization-fluorescent detection in real time mode using the «AmpliSens® HBV-FL» commercial kit (FBIS CRIE, Moscow).

Later, a technique developed in the St. Petersburg Pasteur Institute was used to detect HBV in biological material with low viral load. The following composition of the amplification mixture for PCR was generally used: 15 pM of each oligoprimers, 1.0 mM of each nucleoside triphosphate, 6.7 mM MgCl₂, 1 unit of recombinant Taq DNA polymerase (Fermentas), buffer for Taq DNA polymerase (750 mM Tris-HCl, (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20), 10% DMSO, 1 µg matrix, water without nucleases to a final volume of 25 µl. Amplification in general was carried out under the following conditions: after denaturation at 95°C for 5 min, 30–40 amplification cycles were set in the mode: 95°C — 20–40 sec, 55–65°C — 20–30 sec, 72°C — 30–90 sec; then the final elongation at 72°C — 5 min. The quality of the PCR was determined visually in a 2% agarose gel (120 V, 40 min, 1xTBE) stained with ethidium bromide. Specific primers (Syntol, Russia) were used for the amplification and sequencing reaction, the sequence of which was taken from literary sources and were also selected using the NCBI/Primer-BLAST program according to generally accepted recommendations. Overlapping primer pairs were used, jointly flanking 1475 base pairs (bp) fragment, including the recommended for HBV genotyping the 1169 bp Pre-S1/Pre-S2/S area of 2848–3182...1–835 nucleotides, according to the Mart-B47 isolate (HE974377.1) presented in the international GenBank database [16].

The sequencing reaction was carried out according to the instructions to the reagent kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1. (Applied Biosystems, USA), in triplicate, on forward and reverse primers. The reaction mixture for the sequencing reaction comprised: ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Kit 4 µl, primer for sequencing 3.0 µl (concentration of 1.6 µmol/µl), purified amplification product (volume depended on concentration), deionized water to a final volume of the mixture of 20 µl. The reaction was performed on a BIO-RAD CFX96 thermocycler in the mode of 25 amplification cycles were set at 96°C for 10 sec, at 50°C for 5 sec, and at 60°C for 4 min.

Primary amplification and sequencing reactions products were purified according to the following procedure: a mixture of 2 µl of 3M sodium acetate, 2 µl of 0.125 M EDTA and 1 µl of glycogen were added to 20 µl of the amplification product and incubated at room temperature in the presence of a cooled 96% ethyl alcohol for 15 min. Centrifuged at 14 000 rpm, 4°C for 15 min. The supernatant was removed and the precipitate was washed twice with chilled 70% ethyl alcohol, repeating the cold centrifugation procedure. The washed residue was dried.

A purified fragment of sufficient concentration was used for setting up sequencing reactions.

To analyze the product of the sequencing reaction, the purified residue was denatured in formamide and placed in the ABI Prism 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA).

The initial analysis of the fragments obtained during the sequencing was performed using the NCBI Blast program in comparison with the nucleotide sequences presented in the international GenBank database. Alignment of nucleotide sequences was carried out in the MEGA 7.0 program using the ClustalW algorithm [45]. Since for all the regions of viral hepatitis selected for sequencing, a high evolution rate is shown, for the construction of phylogenetic trees and subsequent phylogenetic analysis, considered the distances between sequences by the Neighbor-joining method, which allows the optimization of the tree in accordance with the criterion of “balanced minimum evolution”, and bootstrap analysis for 500 repetitions was carried out in order to evaluate the reliability of the constructed trees [26].

Results and discussion

In Kazakhstan, in 2007, according to WHO, the incidence of hepatitis B exceeded 8%, and antibodies to HBcor were found in 30% of the population [32]. To date, the epidemiological situation of viral hepatitis remains tense. While in Central Kazakhstan the incidence of OHB was significantly reduced [7], in South Kazakhstan there was a tendency of increased incidence of chronic viral hepatitis, first detected [5].

In our study, in the group of HBsAg-negative blood donors, HBV DNA could not be detected using the «AmpliSens® HBV-FL» commercial kit (FBIS CRIE, Moscow). Using our method of detecting HBV DNA at low viral load, HBV was detected in 47 (9.4%) donors. With further sequencing of the samples, their genetic individuality was shown, which was confirmed by the diversity between the nucleotide sequences, which additionally indicates the validity of the detected cases of OHB in blood donors.

It is known, depending on a number of factors (transferred diseases, operations, vaccinations, increased ALAT activity, etc.), a person may be not allowed to give blood temporarily (temporary withdrawal from donation) or permanently (permanent withdrawal from donation). Among donors who had HBV DNA detected, there were 14.9% who performed blood or plasma donation once, including two withdrawal cases; 19.1% who performed blood or plasma donation twice, no withdrawal cases; 38.3%, who performed blood or plasma donation 3–7 times, 4 withdrawal cases, two of which are associated with an elevated level of ALAT; 27.7% who performed blood or plasma donation more than 10 times (12–117 times), all donors except one had withdrawal cases 1 to 9 times, while two donors had 1 withdrawal case, associated with the HBsAg repeated analysis, in seven donors, one or more withdrawal cases were associated with elevated ALAT levels.

Serological markers were detected in 6 (12.7%) patients with HBV DNA, 4 (8.5%) cases with detected HBcor IgG antibodies, 2 (4.2%) cases with detected HBcor IgG and HBe IgG antibodies. Thus, in 41 (87.3%) of the blood donor, OHB was in seronegative form.

For all the samples identified, a nucleotide sequence of Pre-S1/Pre-S2/S area of adequate quality, suitable for further analysis, was obtained. For all samples, the genotype and subgenotype of the virus were determined. Based on the phylogenetic analysis of 47 isolates, it was shown that HBV of genotype D (95.75%) prevails in the examined group and only two patients with HBV genotype A (4.25%) are represented. Among the patients with HBV genotype D, the highest frequency was found in the subgenotype D1 (48.9%) in comparison with the subgenotypes D2 (17.8%) and D3 (33.3%). Thus, among the 47 samples of OHB in HBsAg-negative blood donors were subgenotypes of HBV in the following ratios: D1 — 46.8%, D2 — 17.05%, D3 — 31.9%, A2 — 4.25%, respectively. The intra-group percentage of nucleotide identity among blood donors with HBV subgenotypes D1, D2 and D3 was $98.05 \pm 0.7\%$, $99.1 \pm 0.35\%$ and $98.9 \pm 0.45\%$, respectively. Phylogenetic relationships between the studied isolates of OHB obtained from blood donors from the Republic of Kazakhstan and reference sequences from the international GenBank database are presented in Figure.

It is known that in most of the territory of the former USSR and in the countries of the Baltic region, HBV subgenotype D2 prevails, the subgenotypes A2 and D3 [46] are present, while for the countries of Central Asia the distribution of the HBV subgenotypes shifts towards the predominance of the subgenotype D1. Thus, the high occurrence of the subgenotype D1 corresponds to the previously obtained data on the molecular genetic characteristics of HBV in Central Asia, however, the increased incidence of HBV D2 and D3 is noteworthy.

According to the presented dendrogram, among the isolates D1 there are two subclasses of HBV circulating, most likely, in the territory of the Republic of Kazakhstan, as well as several independent isolates similar in nucleotide sequences with those previously described. Among the D2 isolates, one HBV subcluster and also several independent isolates are determined. Among HBV D3, it is evident that there is a division into two subclusters, which have a high similarity with those previously described in Europe. Thus, HBV in the subgroups represented, apparently, has several independent sources of infection. The high similarity of isolates with the samples from different countries described in the international database is, apparently, the confirmation of numerous independent importations of the virus into the country, including during large migration waves. The identification of subclusters, which have much less similarity to the isolates previously deposited in the database, indicates an independent homologous evolution of HBV in the region.

In the group of blood donors we examined, there were more men than women — 76.8 and 23.2%, respectively. In the analysis of the occurrence of HBV in the group, there were no significant differences ($p = 0.3652$), depending on gender, but there was a trend towards more frequent infection of men (10.1%) than women (6.9%). In the analysis of the distribution of HBV subgenotypes by gender, the subgenotype D1 (75%) prevailed in women compared to D2 and D3 (12.5%); men also had a more frequent subgenotype D1 (41.1%) compared to D2 (17.9%), D3 (35.9%) and A2 (5.1%), but no significant differences were found between the groups. Nevertheless, there is a trend towards a high incidence of the subgenotype D3 in men in this group. The average age in the group of blood donors we examined was 30.5 ± 9.8 years. The average age of donors with detected HBV DNA was 28.2 ± 8.8 years, with the number of donors with OHB less than 20 y.o. being 8.5%, at the age of 20–30 years — 55.3%, at the age of 30–40 years — 23.4%, 40+ years — 12.8%. Thus, among the donors of blood with OHB a large proportion of detected HBV (78.7%) fell on the age group with high sexual activity. Differences in the distribution of HBV subgenotypes, depending on the age of the patient, have not been revealed.

Earlier, we reported on the analysis of genetic variants of HBV in HBsAg-positive primary donors in the Republic of Kazakhstan. HBV subgenotype

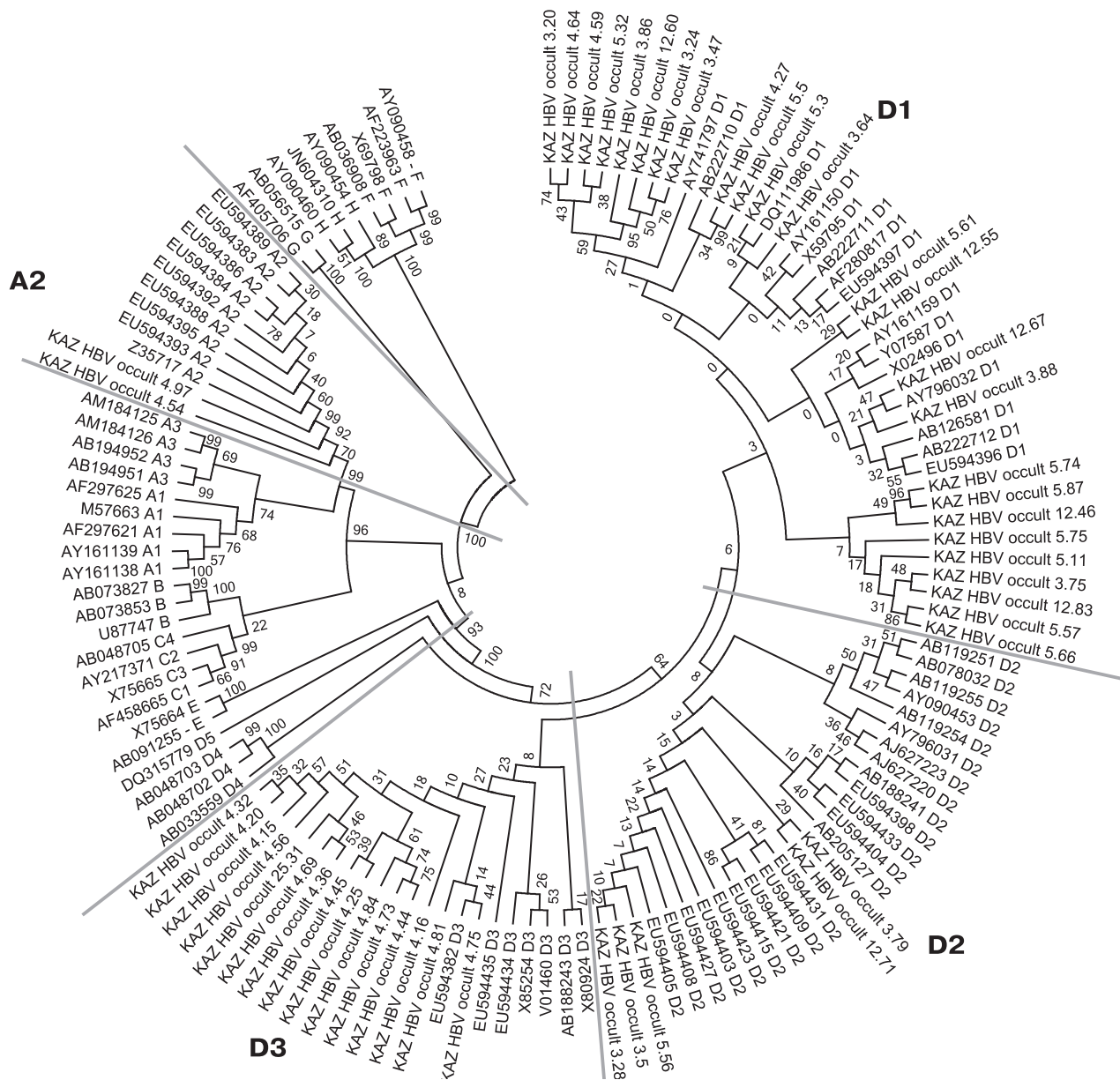


Figure. Dendrogram characterizing the phylogenetic relationships of HBV isolates obtained from blood donors from the Republic of Kazakhstan, in comparison with the reference sequences presented in the international GenBank database

D1 (85.2%) prevailed compared to HBV subgenotype D2 (3.7%) and subgenotype D3 (7.4%), one sample revealed an HBV genotype A subgenotype A1 (3.7%) [3]. Using a comparative analysis, the distribution of HBV subgenotypes in the group with OHB and in the symptomatic form of the disease in donors in the Republic of Kazakhstan significantly differed — $\chi^2 = 14.027$ at $p = 0.0072$, $d_f = 4$. The incidence of HBV D3 with OHB (31.9%) was significantly higher than that of patients with a symptomatic form (7.4%). At the same time, the relative risk of development of occult form CHBV in patients with the subgenotype D3 is significantly higher (RR = 1.572, CI: 1.179 — 2.096, $p = 0.0208$). It should be noted that the data obtained on the distribution of HBV sub-

genotypes among patients with OHB also differ from the distribution of HBV subgenotypes in the symptomatic form of the disease in such nearby countries of Central Asia as Uzbekistan (D1 = 80.95%, D2 = 4.75% D3 — 14.3%) and Kyrgyzstan (D1 — 68.75%, D2 — 18.75%, D3 — 12.3%) [4, 6].

It can be assumed that the high incidence of HBV D3 in HBsAg-negative blood donors is related to the course of the disease, but it should be noted that the prevalence of D3 isolates in Astana was, according to the published data, rather high and amounted to 20.4% [8]. We assume that the relatively high frequency of occurrence of the subgenotypes D2 and D3 and the predominant detection of OHB in the sexually active age group are interrelated.

An indirect confirmation of our assumption is the work that showed the prevalence of HBV D2 and D3 in patients who recognized risky sexual behavior, while a group of patients who claimed to have been infected by surgery or blood transfusion shown many subgenotypes. This may be due to the fact that patients who underwent surgery and blood transfusion were exposed to several sources of infection [40].

The prevalence of OHB in different geographic regions differs, but mainly correlates with prevalence of the symptomatic HBV in the region. However, the data on the study of blood donors, stem cells, and organs for the presence of OHB are little and contradictory. For example, among blood donors in Argentina ($n = 70\ 102$), HBV was detected in only 0.06% of the samples, of which only four were OHB [35]. In the Lao People's Democratic Republic, the prevalence of OHB among HBsAg-negative blood donors was 10.9% [23]. In Nigeria, the incidence of OHB among blood donors reached 17% [35]. In the analysis of healthy stem cell donors from South Korea, OHB was detected in 15.3%, which, like in the case of a significant occurrence of OHB in the population, can be explained by the high prevalence of hepatotropic viruses in this geographic region [20]. In Indonesia, occult HBV was detected in 8.1% of blood donors [44]. In Iran, since the routine neonatal vaccination against HBV was adoption in 1993, the prevalence of the virus was about 1.7% [37]. Nevertheless, the general data vary depending on the methods of virus definition, including the variety of commercial kits for detecting HBsAg and HBV DNA, and the reported prevalence of OHB, especially among healthy blood donors, varies. For example, the prevalence of HBsAg in the Iranian population and in blood donors is 2.6% and 0.4%, respectively, while the prevalence of OHB among blood donors was estimated to be slightly more than 4% [10, 42, 46].

Data on the prevalence of OHB in the population of the Republic of Kazakhstan could not be found, but it can be assumed that with such a high prevalence among blood donors, in the population, the OHB can also be widely spread. When assessing the HBV diversity using the material of the entire surveyed group, including HBsAg-negative and HBsAg-positive blood donors, the close genetic relationship of the isolates of the symptomatic CHBV and the OHB genotype D becomes evident, which also indicates the prevalence of OHB in the region.

Conclusion

Detection of HBV DNA is a complex task for effective laboratory diagnosis of hepatitis, especially where PCR is not accepted as one of the screening methods for detecting HBV, which is important for highly endemic viral hepatitis regions.

The high incidence of OHB among HBsAg-negative blood donors is indicative not only of the widespread prevalence of the occult form of the disease course in the population and the failure to detect HBV of conventional HBsAg and HBV DNA assays in the peripheral blood using commercial kits, but also the need to study the features of the immune response with a given form of the disease course of CHBV.

Despite the fact that the best international standards for screening donor blood for markers of transfusion infections have been introduced in Kazakhstan, the systematic application of molecular phylogenetics in the analysis of OHB in blood donors can contribute to an understanding of the epidemiology of the infectious process, the identification of the features of the spread and the role of "imported" HBV genotypes in the circulation of the virus in the region.

Список литературы/References

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации: аналитический обзор. СПб: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2016. 152 с. [Virusnye gepatity v Rossiiskoi Federatsii: analiticheskii obzor [Viral hepatitis in the Russian Federation: an analytical review]. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2016. 152 p.]
2. Жибурт Е.Б., Губанова М.Н., Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Шестаков Е.А., Мамадалиев Д.М., Мадзаев С.Р. Новое в трансфузиологии (на конгрессах Международного общества переливания крови в Канкуне и Куала-Лумпуре) // Трансфузиология. 2014. Т. 15, № 3. С. 44–60. [Zhiburt E.B., Gubanova M.N., Skorikova S.V., Burkitbaev Z.K., Shestakov E.A., Mamadaliev D.M., Madzaev S.R. News in transfusion medicine (at congresses of the international society of blood transfusion in Cancun and Kuala-Lumpur). *Transfuziologiya = Transfusiology*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 44–60. (In Russ.)]
3. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р., Шестаков Е.А., Вергопуло А.А. Менеджмент крови пациента. М.: Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова, 2014. 64 с. [Zhiburt E.B., Madzaev S.R., Shestakov E.A., Vergopulo A.A. *Menedzhment krovi patsienta* [Blood management of the patient]. Moscow: National Pirogov Medical and Surgical Center, 2014. 64 p. (In Russ.)]
4. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотолян А.А. Генетические варианты вируса гепатита В у первичных доноров в г. Астана, Казахстан // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 359–365. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbaev Z.K., Savchuk T.N., Totolian A.A. Genetic variants of hepatitis B virus in primary donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 359–365. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-359-365 (In Russ.)]

5. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабаев Э.И., Тотолян А.А. Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом/циррозом печени в Узбекистане // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 34–43. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Faizullaev Kh.N., Kazakova E.I., Kozlov A.V., Musabaev E.I., Totolyan A.A. Molecular-biological markers of hepatitis B in patients with liver fibrosis/cirrhosis in Uzbekistan. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 34–43. (In Russ.)]
6. Полукчи Т.В., Абуова Г.Н., Батырханова С.Т. Состояние заболеваемости острыми и хроническими вирусными гепатитами в Южно-Казахстанской области // Международный студенческий научный вестник. 2016. № 4. С. 39–40. [Polukchy T.V., Abuova G.N., Batorykhanova S.T. The incidence of acute and chronic viral hepatitis in the South Kazakhstan region. *Mezhdunarodnyi studencheskii nauchnyi vestnik = International Student Scientific Bulletin*, 2016, no. 4, pp. 39–40. (In Russ.)]
7. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Лаврентьева И.Н., Тобокалова С.Т., Тотолян А.А. Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВГД в Кыргызстане // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 141–150. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T., Lavrentieva I.N., Tobokalova S.T., Totolyan A.A. Molecular epidemiology features of HBV/HDV co-infection in Kyrgyzstan. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-141-150 (In Russ.)]
8. Шайзадина Ф.М., Кошерова Б.Н., Омарова А.О. Эпидемический процесс вирусного гепатита В на территории Северо-Казахстанской области // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 3. С. 123–124. [Shayzadina F.M., Kosherova B.N., Omarov A.O. The epidemic process of viral hepatitis B in the territory of the North Kazakhstan region. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 123–124. (In Russ.)]
9. Шевцов А.Б., Филипенко М.Л., Киянбекова Л.С., Кравченко А.П., Омралина А.Е., Абеев А.Б., Мухамедьяров Д.А., Раманкулов Е.М. Генотипы вируса гепатита В, циркулирующие на территории г. Астана // Биотехнология. Теория и практика. 2011. № 4. С. 14–23. [Shevtsov A.B., Filipenko M.L., Kiyankbekova L.S., Kravchenko A.P., Omralina A.E., Abeev A.B., Mukhamedyarov D.A., Ramankulov E.M. Genotypes of the hepatitis B virus, circulating in the territory of Astana. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika = Biotechnology. Theory and Practice*, 2011, no. 4, pp. 14–23. (In Russ.)]
10. Alavian S.M. Occult hepatitis B virus infection among hemodialysis patients. *Hepat. Mon.*, 2012, vol. 12, no 4, pp. 242–243. doi: 10.5812/hepatmon.869
11. Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson V.H., Magnius L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.*, 2002, vol. 83, no. 8, pp. 2059–2073. doi: 10.1099/0022-1317-83-8-2059
12. Baumert T.F., Thimme R., von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, no. 1, pp. 82–90. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.82
13. Beasley R.P., Hwang L.Y., Lee G.C., Lan C.C., Roan C.H., Huang F.Y., Chen C.L. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet*, 1983, vol. 2 (8359), pp. 1099–1102.
14. Bes M., Vargas V., Piron M., Casamitjana N., Esteban J. I., Vilanova N., Pinacho A., Quer J., Puig L., Guardia J., Sauleda S. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J. Hepatol.*, 2012, vol. 56, no. 4, pp. 765–774. doi: 10.1016/j.jhep.2011.11.011
15. Bissinger A.L., Fehrle C., Werner C.R., Lauer U.M., Malek N.P., Berg C.P. Epidemiology and genotyping of patients with chronic hepatitis b: genotype shifting observed in patients from Central Europe. *Pol. J. Microbiol.*, 2015, vol. 64, no. 1, pp. 15–21.
16. Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., Césaire R., Gordien E. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.*, 2013, vol. 94, iss. 10, pp. 2318–2329. doi: 10.1099/vir.0.055459-0
17. De Mitri M.S., Cassini R., Bernardi M. Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections. *Eur. J. Cancer.*, 2010, vol. 46, pp. 2178–2186. doi: 10.1016/j.ejca.2010.03.034
18. Dufour D.R. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) assays-are they good enough for their current uses? *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 8, pp. 1457–1459. doi: 10.1373/clinchem.2006.072504
19. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. *Lancet*, 2015, vol. 385, no. 385 (9963), pp. 117–171. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2
20. Hui C. K., Sun J., Au W.Y., Lie A.K., Yueng Y.H., Zhang H.Y., Lee N.P., Hou J.L., Liang R., Lau G.K. Occult hepatitis B virus infection in hematopoietic stem cell donors in a hepatitis B virus endemic area. *J. Hepatol.*, 2005, vol. 42, iss. 6, pp. 813–819. doi: 10.1016/j.jhep.2005.01.018
21. Hyams K.C. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, vol. 20, no. 4, pp. 992–1000.
22. Jeantet D., Chemin I., Mandrand B., Tran A., Zoulim F., Merle P., Trepo C., Kay A. Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays. *J. Med. Virol.*, 2004, vol. 73, iss. 4, pp. 508–515. doi: 10.1002/jmv.20119
23. Jutavijittum P., Andernach I.E., Yousukh A., Samounry B., Samounry K., Thammavong T., Keokhamphue J., Toriyama K., Muller C.P. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox. Sang.*, 2014, vol. 106, iss. 1, pp. 31–37. doi: 10.1111/vox.12073
24. Kao J.-H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J. Intern. Med.*, 2011, vol. 26, no. 3, pp. 255–261. doi:10.3904/kjim.2011.26.3.255

25. Kramvis A., Paraskevis D. Subgenotype A1 of HBV – tracing human migrations in and out of Africa. *Antivir. Ther.*, 2013, vol. 18 (3 B), pp. 513–521. doi: 10.3851/IMP2657
26. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, iss. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
27. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2015, vol. 5, no. 5:a021436. doi: 10.1101/cshperspect.a021436
28. Margolis H.S., Alter M.J., Hadler S.C. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin. Liver Dis.*, 1991, vol. 11, no. 2, pp. 84–92. doi: 10.1055/s-2008-1040427
29. McMahon B.J., Alward W.L., Hall D.B., Heyward W.L., Bender T.R., Francis D.P., Maynard J.E. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J. Infect. Dis.*, 1985, vol. 151, no. 4, pp. 599–603.
30. Mulrooney-Cousins P.M., Michalak T.I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, no. 43, pp. 5682–5686. doi: 10.3748/wjg.v13.i43.5682
31. Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004, vol. 47, no. 6, pp. 289–309. doi: 10.1159/000080872
32. Nurgalieva Z.Z., Hollinger F.B., Graham D.Y., Zhangabylova S., Zhangabylov A. Epidemiology and transmission of hepatitis B and C viruses in Kazakhstan. *World J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, no. 8, pp. 1204–1207. doi: 10.3748/wjg.v13.i8.1204
33. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, pp. 2575–2583. doi: 10.1099/0022-1317-69-10-2575
34. Oluyinka O.O., Tong H.V., Bui Tien S., Fagbami A.H., Adekanle O., Ojuronbe O., Bock C.T., Kreamsner P.G., Velavan T.P. Occult Hepatitis B Virus Infection in Nigerian Blood Donors and Hepatitis B Virus Transmission Risks. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7:e0131912. doi: 10.1371/journal.pone.0131912
35. Pisano M.B., Blanco S., Carrizo H., Ré V.E., Gallego S. Hepatitis B virus infection in blood donors in Argentina: prevalence of infection, genotype distribution and frequency of occult HBV infection. *Arch. Virol.*, 2016, vol. 161, no. 10, pp. 2813–2817. doi: 10.1007/s00705-016-2960-2
36. Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Cacciola I., Raffa G., Craxi A., Farinati F., Missale G., Smedile A., Tiribelli C., Villa E., Raimondo G. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*, 2004, vol. 126, iss. 1, pp. 102–110. doi: 10.1053/j.gastro.2003.10.048
37. Poorolajal J., Majdzadeh R. Prevalence of chronic hepatitis B infection in Iran: a review article. *J. Res. Med. Sci.*, 2009, vol. 14, no. 4, pp. 249–258.
38. Pourkarim M.R., Lemey P., Amini-Bavil-Olyae S., Houspie L., Verbeeck J., Rahman M., Maes P., Vanwijngaerden E., Nevens F., Van Ranst M. Molecular characterization of hepatitis B virus strains circulating in Belgian patients co-infected with HIV and HBV: Overt and occult infection. *J. Med. Virol.*, 2011, vol. 83, iss. 11, pp. 1876–1884. doi: 10.1002/jmv.22174
39. Raimondo G., Allain J.P., Brunetto M.R., Buendia M.A., Chen D.S., Colombo M., Craxi A., Donato F., Ferrari C., Gaeta G.B., Gerlich W.H., Levvero M., Locarnini S., Michalak T., Mondelli M.U., Pawlotsky J.M., Pollicino T., Prati D., Puoti M., Samuel D., Shouval D., Smedile A., Squadrito G., Trepo C., Villa E., Will H., Zanetti A.R., Zoulim F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2008, vol. 49, iss. 4, pp. 652–657. doi: 10.1016/j.jhep.2008.07.014
40. Sarkar N., Pal A., Das D., Saha D., Biswas A., Bandopadhyay B., Chakraborti M., Ghosh M., Chakravarty R. Virological characteristics of acute hepatitis B in Eastern India: critical differences with chronic infection. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 11: e0141741. doi: 10.1371/journal.pone.0141741
41. Shapiro C.N. Epidemiology of hepatitis B. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1993, vol. 12, no. 5, pp. 433–437.
42. Smolle E., Zohrer E., Bettermann K., Haybaeck J. Viral hepatitis induces hepatocellular cancer: what can we learn from epidemiology comparing Iran and worldwide findings? *Hepat. Mon.*, 2012, vol. 12 (10 HCC):e7879. doi: 10.5812/hepatmon.7879
43. Tallo T., Tefanova V., Priimagi L., Schmidt J., Katargina O., Michailov M., Mukomolov S., Magnius L., Norder H. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.*, 2008, vol. 89, iss. 8, pp. 1829–1839. doi: 10.1099/vir.0.83660-0
44. Thedja M.D., Roni M., Harahap A.R., Siregar N.C., Ie S.I., Muljono D.H. Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. *Hepatol. Int.*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 608–614. doi: 10.1007/s12072-010-9203-5
45. Thompson J.D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 1994, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680.
46. Vaezjalali M., Rashidpour S., Rezaee H., Hajibeigi B., Zeidi M., Gachkar L., Aghamohamad S., Najafi R., Goudarzi H. Hepatitis B viral DNA among HBs antigen negative healthy blood donors. *Hepat. Mon.*, 2013, vol. 13, no. 3:e6590. doi: 10.5812/hepatmon.6590
47. World Health Organization. Prevention and control of viral hepatitis infection: frame work for global action. Geneva: WHO, 2012. URL: <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/Framework/en/> (13.12.2017)
48. Yuen M.F., Lai C.L. Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, vol. 1, pp. 321–328. doi: 10.1586/17474124.1.2.321

49. Yim H.J., Lok A.S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*, 2006, vol. 43, iss. S1, pp. S173–S181. doi: 10.1002/hep.20956
50. Zerbini A., Pilli M., Boni C., Fiscaro P., Penna A., Di V. P., Giuberti T., Orlandini A., Raffa G., Pollicino T., Raimondo G., Ferrari C., Missale G. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, iss. 5, pp. 1470–1481. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.017

Авторы:

Останкова Ю.В., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Семенов А.В., к.б.н., зав. лабораторией вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Буркитбаев Ж.К., к.м.н., директор Научно-производственного центра трансфузиологии, Астана, Республика Казахстан;

Савчук Т.Н., зав. отделением лабораторных исследований трансфузионных инфекций, РГП на ПХВ Научно-производственного центра трансфузиологии, Астана, Республика Казахстан;

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

Authors:

Ostankova Ju.V., Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Semenov A.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Virology and Immunology HIV, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Burkitbayev Z.K., PhD (Medicine), Director of Research-Production Center of Transfusiology, Astana, Kazakhstan Republic;

Savchuk T.N., Head of Department of Laboratory Studies of Transfusion Infections, Research-Production Center of Transfusiology, Astana, Kazakhstan Republic;

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

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В ГЕНОМЕ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА МАЛЫХ ГОМОЛОГИЧНЫХ И КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ФРАГМЕНТОВ И ВОЗМОЖНАЯ ИХ РОЛЬ

Е.П. Харченко

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С помощью компьютерного анализа исследована распространенность аутокомплементарных, комплементарных и гомологичных последовательностей (КП и ГП) (длиной в 21 нуклеотид) в геномах 14 вирусов, вызывающих наиболее распространенные инфекции у человека. Выборка вирусов включала вирусы с (+) и (–) односпиральной РНК и ДНК-содержащий вирус гепатита В. Выполненный анализ по распространенности ГП свидетельствует о существовании двух ее экстремальных показателей: с одной стороны, имеет место наличие у одного и того же вируса ГП практически ко всем другим вирусам (например, вирусы Эбола, тяжелого острого респираторного синдрома и паротита) и многочисленности у него же ГП к одному и тому же другому вирусу (у вируса тяжелого острого респираторного синдрома особенно к вирусу Денге, вирусу Эбола и полиовирусу), и, с другой стороны, редкая встречаемость и немногочисленность ГП для некоторых вирусов (вирус краснухи, вирус гепатита А и гепатита В). Сходная картина отмечается и в распространенности КП. Вирус краснухи, имеющий резко отличный от других РНК-содержащих вирусов нуклеотидный состав его генома, также отличался по максимальному числу вирусов, к которым он не имеет КП. Большинство же исследованных вирусов по обоим показателям ГП и КП имеют промежуточные величины между экстремальными значениями. АутоКП длиной в ≤ 19 нуклеотидов были многочисленны у всех исследованных вирусов, что предполагает наличие у вирусов с онРНК разветвленной вторичной структуры. Помимо возможной роли в рекомбинации внутритиповых штаммов, аутоКП могли бы через фолдинг геномов и мРНК быть регуляторами скорости трансляции вирусных белков, обеспечивая оптимальное количественное соотношение их для сборки вирионов. Обнаружение распространенности коротких ГП и КП среди РНК- и ДНК-содержащих вирусов можно рассматривать как результат многократной рекомбинации между ними, свершавшейся в прошлом и возможной в настоящем и определяющей их изменчивость и адаптацию. Рекомбинация могла происходить при коинфицировании ими человека или других общих для них хозяев. Включение в геном вирусов ГП и КП не только обновляло их, но и могло бы служить и памятью о существовании конкурента (противника) за овладение хозяином, и средством противодействия конкуренту при коинфицировании, являясь аналогией системы CRISPR/Cas бактерий и архей.

Ключевые слова: рекомбинация вирусов, геном вирусов, гомологичные последовательности, комплементарные последовательности, аутокомплементарные последовательности, интерференция вирусов.

Адрес для переписки:

Харченко Евгений Петрович
194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44,
ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.
Тел./факс: 8 (812) 552-70-31 (служебн.); 8 904 338-22-80 (моб.).
E-mail: neuro.children@mail.ru

Contacts:

Eugene P. Kharchenko
194223, Russian Federation, St. Petersburg, Toreza pr., 44,
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry.
Phone/Fax: +7 (812) 552-70-31 (office); +7 904 338-22-80 (mobile).
E-mail: neuro.children@mail.ru

Библиографическое описание:

Харченко Е.П. Распространенность в геноме вирусов человека малых гомологичных и комплементарных фрагментов и возможная их роль // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 393–404. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-393-404

Citation:

Kharchenko E.P. Occurrence of small homologous and complementary fragments in human virus genomes and their possible role // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 393–404. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-393-404

OCCURRENCE OF SMALL HOMOLOGOUS AND COMPLEMENTARY FRAGMENTS IN HUMAN VIRUS GENOMES AND THEIR POSSIBLE ROLE

Kharchenko E.P.

I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. With computer analysis occurrence of small homologous and complementary fragments (21 nucleotides in length) has been studied in genomes of 14 human viruses causing most dangerous infections. The sample includes viruses with (+) and (–) single stranded RNA and DNA-containing hepatitis A virus. Analysis of occurrence of homologous sequences has shown the existence two extreme situations. On the one hand, the same virus contains homologous sequences to almost all other viruses (for example, Ebola virus, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus, and mumps virus), and numerous homologous sequences to the same other virus (especially in severe acute respiratory syndrome-related coronavirus to Dengue virus and in Ebola virus to poliovirus). On the other hand, there are rare occurrence and not numerous homologous sequences in genomes of other viruses (rubella virus, hepatitis A virus, and hepatitis B virus). Similar situation exists for occurrence of complementary sequences. Rubella virus, the genome of which has the high content of guanine and cytosine, has no complementary sequences to almost all other viruses. Most viruses have moderate level of occurrence for homologous and complementary sequences. Autocomplementary sequences are numerous in most viruses and one may suggest that the genome of single stranded RNA viruses has branched secondary structure. In addition to possible role in recombination among strains autocomplementary sequences could be regulators of translation rate of virus proteins and determine its optimal proportion in virion assembly with genome and mRNA folding. Occurrence of small homologous and complementary sequences in RNA- and DNA-containing viruses may be the result of multiple recombinations in the past and the present and determine their adaptation and variability. Recombination may take place in coinfection of human and/or common hosts. Inclusion of homologous and complementary sequences into genome could not only renew viruses but also serve as memory of existence of a competitor for host and means of counteraction against a competitor in coinfection being an analogy of the bacterial CRISPR/Cas system.

Key words: *recombination of viruses, virus genome, homologous sequences, complementary sequences, autocomplementary sequences, virus interference.*

Молекулярная биология вирусов/бактериофагов часто свидетельствует о наличии у них прообразов структур и процессов, свойственных их более высокоорганизованным хозяевам, подтверждая тем самым универсальность принципов молекулярной организации живых существ. Наше сознание обычно оказывается скованным в признании существования у вирусов систем, свойственных их хозяевам, из-за малых размеров геномов и простоты организации вирусов. Лишь в последнее десятилетие стала вырисовываться сложная сеть молекулярных взаимодействий компонентов вируса в поражаемой клетке и, наконец, получила признание вовлеченность в инфекционный процесс вирусных некодирующих РНК (внРНК). Круг вирусов, у которых выявлены внРНК разных размеров, все больше расширяется, и в их числе представители *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae* и *Orthomyxoviridae*. В жизненном цикле этих вирусов внРНК играют роль в регуляции репликации, персистенции, клеточной трансформации и ускользании от иммунной системы хозяина [17].

Применение методов секвенирования нового поколения позволило выявить при инфекциях разными вирусами у различных организмов (от клеща до мыши) образование и накопление в клетке малых вирусных РНК (мвРНК) в результате деградации различными путями синтезируемых вирусных РНК. Хотя длина, полярность и нуклеотидный состав мвРНК ва-

рировали в зависимости от вирусного субстрата и механизма деградации их хозяином, среди них четко выступало преобладание мвРНК размером в 20–23 нуклеотидов. Характерно, что появление мвРНК у разных животных часто обнаруживает профиль, соответствующий активации образования малых интерферирующих РНК [4]. В этой связи возник вопрос, не могут ли содержаться у вирусов среди их мвРНК такие, которые гомологичны или комплементарны последовательностям генома другого вируса или аутокомплемментарны. Их наличие позволило бы расширить понимание роли мвРНК в инфекционном процессе и обосновать возможное соучастие их в других феноменах вирусов, таких как рекомбинация, изменчивость и интерференция. Поэтому цель настоящего исследования состояла в изучении распространенности среди патогенных для человека вирусов с однонитевыми РНК (онРНК) и ДНК малых гомологичных (ГП) и комплементарных (КП) нуклеотидных последовательностей, а также в пределах генома каждого вируса аутокомплемментарных последовательностей (аутоКП).

Методы

Для компьютерного анализа были использованы последовательности геномов 13 вирусов с онРНК и 1 вирус с неполной двуспиральной ДНК [вирус гепатита В (штамм ауw)], патогенные для человека. В их числе вирусы с (–)

онРНК [вирус кори (штамм ICHINOSE-BA), паротита (штамм MIYAHARA VACCINE), Эбола (Zaire ebolavirus strain Ebola virus/H sapiens-rec/LBR/2014/Makona-L2014_ZsG), Борна (штамм V)], вирусы с (+) онРНК [вирусы гепатитов А (генотип IВ, изолят НМ175) и С (генотип Iа, изолят Н), краснухи (штамм Therien), полиовирус (штамм Sabin), вирус лихорадки Денге (штамм Nauru/West Pac/1974), вирус Зика (штамм Mr 766) и вирус тяжелого острого респираторного синдрома (ВТОРС) (изолят Tor2)], вирус с фрагментированным (–)онРНК геномом [вирус гриппа (A/California/08/2009(H1N1)] и вирус с обратной транскриптазой [вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ 1, группа М подтип В (изолят НХВ2)], Источником первичных структур вирусных геномов и их общих параметров служили доступные в Интернете базы данных (www.ncbi.nlm.nih.gov, <http://viralzone.expasy.org>).

Нуклеотидные последовательности геномов вирусов подвергались компьютерному анализу на присутствие аутоКП, а между парами вирусов выявляли взаимно КП и ГП длиной в 21 нуклеотид, допуская наличие в них соответственно 1–3 неспаренных нуклеотидов и 1–3 неидентичных позиций.

Выбор длины фрагментов в 21 нуклеотид был мотивирован с распространенностью ее у мвРНК [4], длиной малых интерферирующих РНК эукариот [12] и последовательностей в *tracrRNA* (адаптивная система CRISPR/Cas бактерий и архей), которые осуществляют комплементарное связывание с геномом фагов [5], и внРНК вируса гриппа А [13, 14, 20].

Результаты

Выполненный анализ по распространенности ГП свидетельствует о существовании двух ее экстремальных показателей: с одной стороны, имеет место наличие у одного и того же вируса ГП практически ко всем другим вирусам и многочисленности у него же ГП к одному и тому же другому вирусу (далее кратко оба показателя будем именовать соответственно «множественностью ГП» и «многократностью ГП»), и, с другой стороны, редкая встречаемость и немногочисленность ГП для некоторых вирусов. То же самое отмечается и в распространенности КП. Большинство же исследованных вирусов по обоим показателям ГП имеют промежуточные величины между экстремальными значениями.

Даже при известной высокой скорости репликации и изменчивости спонтанное возникновение в пределах генома одного и того же вируса более 40 ГП и не меньшего числа КП (например, у ВТОРС) длиной в 21 нуклеотид и уровнем идентичности $\geq 85\%$ (при минимальности множественности и многократности ГП у другого вируса, например у вируса краснухи) представляется маловероятным, и единственной

альтернативой объяснению существования ГП (как и КП) у вирусов остается возникновение их за счет рекомбинации между ними.

Анализ геномов различных вирусов другими авторами также показал, что между разными по своей природе вирусами происходила рекомбинация геномов [8, 10, 17]. Рекомбинировали между собой также РНК- и ДНК-содержащие вирусы. В частности, у вирусов с двуспиральной ДНК выявлены последовательности генов вирусов с онДНК (например в геноме вируса герпеса 7 выявлены последовательности генома парвовируса), а у вирусов с онДНК выявлены последовательности генов вирусов с онРНК [17]. У более чем 3000 вирусных геномов, охватывающих 120 000 генов, 10% вирусных генов являются химерами. В целом (+) онРНК- и онДНК-содержащие вирусы были более склонны обладать химерными генами, чем (–) онРНК-содержащие вирусы [8]. Поэтому далее по тексту изложение результатов и обсуждение их ведется именно в аспекте распространенности рекомбинации среди вирусов, происходившей многократно в прошлом.

Для удобства и упрощения визуализации сети связей между вирусами по наличию в них ГП и КП в рисунках 1 и 3 были использованы две параллельные идентичные колонки, в строках которых приведены названия вирусов. Строки между колонками соединялись попарно в соответствии с наличием у вирусов ГП (или КП). Для каждого вируса общее число других вирусов, с которыми он разделяет ГП (или КП), равно сумме лучей, исходящих от него в правой и левой колонках.

В целом исследование показало, что ГП охватывают разные пары вирусов и каждый вирус отличается по множественности и многократности ГП. В анализируемой нами выборке большинство вирусов с (+)онРНК, что отражает существенное их преобладание среди вирусов не только человека, но и эукариот. Из многочисленного списка выявленных пар ГП фрагментов на рисунке 2 представлены некоторые из них. Представителей *Mononegavirales* отличает близкое генетическое родство, что четко прослеживается в порядке расположения генов в их геномах и наличием протяженных гомологичных последовательностей особенно в гене РНК-полимеразы. Поэтому на рисунке 2 не представлены те пары ГП, которые образованы двумя представителями *Mononegavirales* (вирусы кори, паротита, Эбола и Борна).

На рисунке 1, отображающем попарно связи между всеми исследованными нами вирусами, видно, что вирусы Эбола, паротита и ТОРС имеют ГП с наибольшим числом вирусов, в то время как вирусы краснухи, гепатита А и гепатита В не имеют их с большинством вирусов. Поскольку первые принадлежат к вирусам с онРНК разной полярности, то из этого можно было бы предположить, что полярность РНК не является барьер-

ром для рекомбинации между вирусами. Однако, в противоположность вирусу Эбола, другие представители семейства *Mononegavirales* — вирусы кори, паротита, Борна — чаще всего не разделяли ГП с вирусами, имеющими (+) онРНК. Общая особенность вирусов ТОРС, Эбола и паротита — самые большие геномы среди исследованных нами вирусов (соответственно 29,75; 18,96 и 15 kb), а первые два из них имеют наибольшие среди РНК-содержащих вирусов геномы, что, по-видимому, определяет их повышенный потенциал к рекомбинации и «ассимилированию» внедряющихся в их геном новых фрагментов. Для ВТОРС характерна и многократность ГП к большинству вирусов и особенно к вирусам денге, Эбола и полиовирусу (до 10 разных ГП). Меньшие показатели по многократности ГП имеют пары ВТОРС—вирус паротита, ВТОРС—ВИЧ 1, ВИЧ 1—вирус денге, вирус гепатита С—вирус Эбола, вирус денге—вирус Эбола. Следует подчеркнуть, что связность в парах вирусов по обладанию ими ГП (рис. 1) в значительной степени обусловлена внедрением в вирусы с крупным геномом фрагментов генома разных вирусов (и с крупным, и с малым геномом) и, в меньшей степени, приобретением вирусами с малыми геномами фрагментов генома других вирусов.

Наиболее выраженные ограничения с рекомбинацией у вирусов краснухи, гепатита А и гепатита В (у всех троих геном (+)онРНК) по-видимому связаны с разными причинами, в числе которых их уникальность. К примеру, вирус краснухи выделяется среди всех РНК-содержащих вирусов наиболее высоким процентом ГЦ (69,6%), и вторжение в его геном фрагментов с более низким процентом ГЦ, как и вторжение в геном других вирусов фрагментов РНК с высоким процентом ГЦ, привело бы к структурно-функциональным коллизиям. РНК вируса гепатита А отличается наиболее низким процентом ГЦ (37,9%) и малой длиной. Для вирус гепатита В свойственны очень маленький размер генома, уникальная среди вирусов его организация (частично двуспиральная ДНК) и наиболее сложный среди других вирусов жизненный цикл, который оказался в эволюции малоперспективным, судя по крайней малочисленности группы VII по классификации Балтимора, в которой семейство *Hepadnaviridae* представлено лишь вирусом гепатита В.

Картина распространенности среди вирусов КП частично перекрывается с таковой для ГП, но в целом, как и в случае ГП, КП охватывают разные пары вирусов и каждый вирус отличает-

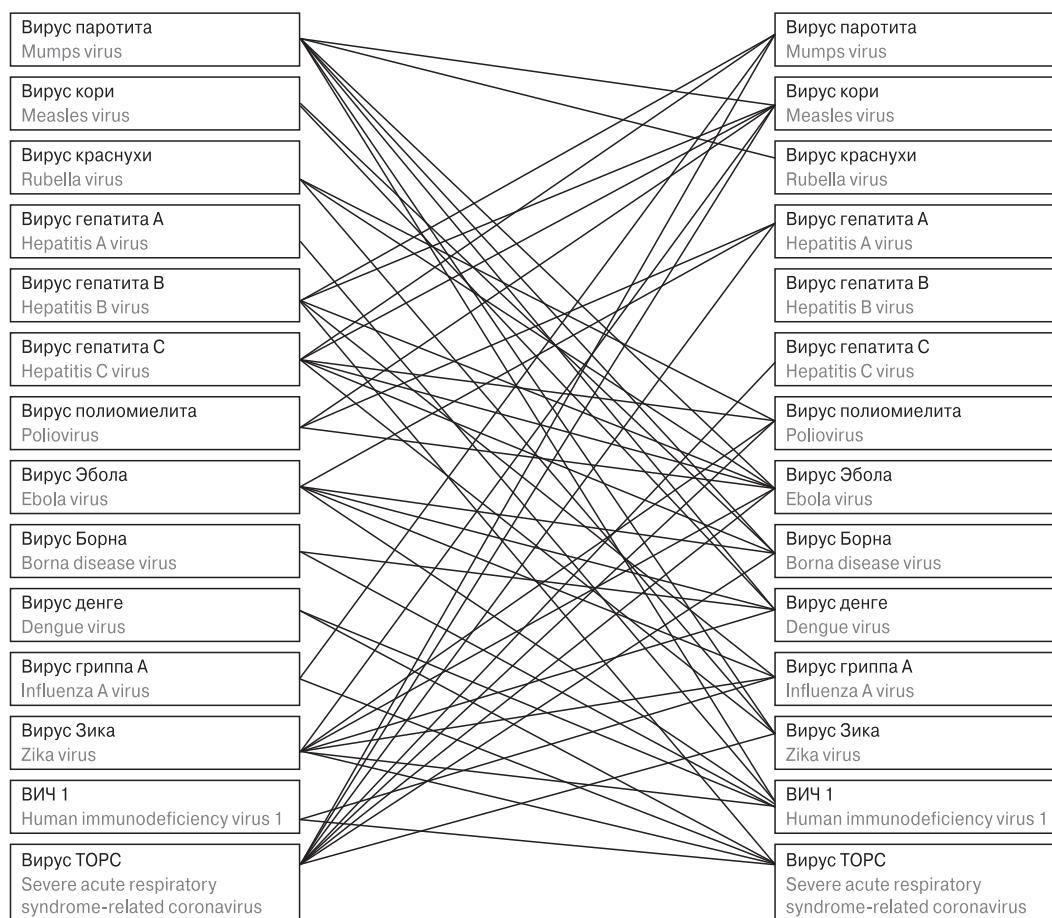


Рисунок 1. Схема связности вирусов по наличию в их геномах гомологичных последовательностей
 Figure 1. Connection scheme of viruses according to the presence of homologous sequences in their genomes

TCTCCATGGTGGGGAACCTGGG . . . TCTCTATGGTGGGGAACCTGGC	(1425–1446) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus (8147–8168) Вирус Зика / Zika virus
TTGTACCATCAATTACCCAT . . . TTCTACCATTAATTACCCAC	(2197–2218) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus (807–828) Полиовирус / Poliovirus
GCCTCACTGTAAACCCAGCTCC . . . TCCTCACTGTAAAGCCAGCTTC	(6189–6210) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus (12003–12024) Вирус Эбола / Ebola virus
TCAATGCCGTGGCCTACTACC . . TCAATGCAGTGGCCTTCAACC	(4575–4596) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus (3984–4005) Вирус кори / Measles virus
GGACCTGTGCGGGTCTGTCTT . . . GGACCTGTGCGGGCTGTGTC	(1174–1195) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus (8209–8230) Вирус Борна / Borna disease virus
ACATCACATCAGGATTCTCTAG . . . ACATCACATCAGGGATCCAAAG	(163–184) Вирус гепатита В / Hepatitis B virus (2161–2182) Вирус паротита / Mumps virus
TAAACSTTATTATCCAGAACA . . . TAAACSTTATTATTCAGATTA	(2694–2715) Вирус гепатита В / Hepatitis B virus (10676–10697) Вирус Эбола / Ebola virus
CAAGACGGCAGGGTTGCTAT . . . CAAGGCGGCTGGGGTTGCTAC	(863–884) Вирус паротита / Mumps virus (7600–7621) Вирус краснухи / Rubella virus
ATTCAAGCACAACTAGAGTAA . . . ATTCAAGCACAAACAGATCAA	(8132–8153) Вирус паротита / Mumps virus (3610–3631) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1
ACCAGAGATCCTTCTCTCGCT . . . ACCAGAGATCCTGCTGTCTCT	(6397–6418) Вирус паротита / Mumps virus (10651–10672) Вирус денге / Dengue virus
CCACACCACCAGGAACCCGTG . . . CCACACCACCAGCGACCCCTG	(5549–5570) Вирус Зика / Zika virus (9183–9204) Вирус краснухи / Rubella virus
ATACCAAACAAGTGGTGAA . . . ACACCAAACAAGCGGTGTA	(9372–9393) Вирус Зика / Zika virus (3393–3414) Полиовирус / Poliovirus
CTAGCTGTGAATCTCCAGCAG . . . CTAGGTGTGAATATCAAGCAG	(10622–10643) Вирус Зика / Zika virus (4977–4998) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1
TAGCCATGACTGACACCACAC TAGCCATGACTGACACCACAC	(8678–8699) Вирус Зика / Zika virus (8591–8612) Вирус денге / Dengue virus
CCGGTGGCGGTGGTTCAGCCT . . . CCGGTGCAGGTGGTCCAGGCT	(1005–1026) Вирус краснухи / Rubella virus (339–360) Полиовирус / Poliovirus
CGCCC GCCCGCCGGCTCCAC . . . CTCCTGCCCGCCGGCTACAC	(1691–1712) Вирус краснухи / Rubella virus (4731–4752) Вирус Эбола / Ebola virus

Рисунок 2 (1-й фрагмент, окончание на с. 398). Гомологичные фрагменты геномов вирусов

Figure 2 (1st part, last part see on page 398). The homologous fragments of virus genomes

Примечание. В скобках указана позиция фрагмента в геномной РНК или ДНК.

Note. In parenthesis the position of the fragment in genome RNA or DNA is presented.

AATCAGACAAATTGTATCATAA . . . AATGAGACAAATTGTTTTCATCA	(722–743) Полиовирус / Poliovirus (11693–11714) Вирус кори / Measles virus
AGGCATTCTTTCATCTCCTTTT . . AGGCATTTTCTTCTCCTTTT	(10706–10727) Вирус Эбола / Ebola virus (4678–4699) Вирус гепатита А / Hepatitis A virus
TCAGCTCACACCCCTTGAGAG . . . TCAGCTACCACCGCTTGAGAG	(7379–7400) Вирус Эбола / Ebola virus (8066–8087) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1
AAAGAAAAGCTGGCCTAACAA . . . AAGGAAAAGCTGGCCTCTCAA	(3105–3126) Вирус Эбола / Ebola virus (4122–4143) Вирус денге / Dengue virus
AAAAGTGATACAGCAAATTTT . . . AAAAC TGATACACCAAGATTTT	(11914–11935) Вирус кори / Measles virus (2232–2253) Вирус денге / Dengue virus
CAGAGGAGAGCAAGAAATGGA . . CAGAGGAGAGGAAGAAATGGA	(5360–5381) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1 (5887–5908) Вирус денге / Dengue virus
CTTTTGGAAGAGAAACAGTTA . . . CTTTTGAAAGAGCAACCGTTA	(2227–2248) Вирус гепатита В / Hepatitis B virus (1255–1276) Вирус гриппа А, белок NP / Influenza A virus, NP protein
AGAATCAAAACTATGCCTTG C . . . AGAATCAAAACTAGGCTTTT C	(5573–5594) Вирус паротита / Mumps virus (507–528) Вирус гриппа А, ген PA / Influenza A virus, PA gene
ACCSTTTAGAGACTATGTAGA . . . AAACTTTAGAGCCTATGTAGA	(1207–1228) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1 (680–701) Вирус гриппа А, ген PA / Influenza A virus, PA gene
TATATGAACTCCAGGGGCTT . . . TACATGAACACCCCGGGGCTT	(11658–11679) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (4964–4985) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus
TGTCATAACTACTAAAATCTC . . . TGTCATAACAACCTGACATCTC	(8450–8471) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (5814–5835) Вирус Зика / Zika virus
TTCTTGCTGCATTGGTTTGT . . . TTCTTGCTGCATTGGTTAAAT	(8536–8557) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (3586–3607) Вирус гепатита А / Hepatitis A virus
AGGAACTGTATCCTGGAATTT . . . AGGAACTGTATCCTTTAACTT	(4295–4316) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (1776–1797) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1

Рисунок 2 (окончание, 1-й фрагмент на с. 397). Гомологичные фрагменты геномов вирусов
Figure 2 (last part, 1st part see on page 397). The homologous fragments of virus genomes

ся по множественности и многократности КП. На рисунке 4 представлены примеры пар КП РНК-содержащих вирусов и вирус гепатита В, а на рисунке 3 схематично представлена связность каждого вируса с теми вирусами, с которыми он разделяет КП. Аналогично распространенности ГП среди вирусов, один и тот же вирус может иметь в его геноме несколько КП к геному другого вируса или вовсе их не иметь. Заведомо было предсказуемо, что вирус краснухи, имеющий резко отличный от других РНК-содержащих вирусов

нуклеотидный состав генома, будет отличаться по максимальному числу вирусов, к которым он не имеет КП. По этому показателю вирус краснухи минимально уступают лишь вирусы гепатита В, Зика, Борна и ВИЧ 1. ВТОРС, как и в случае распространенности ГП, имеет КП к геномам всех других исследованных вирусов (за исключением вируса краснухи), и ему уступают лишь вирусы паротита, кори, гриппа А и денге. Многократность КП у ВТОРС особенно высока к вирусам гепатита С и Эбола, поменьше она к вирусам денге, вирус кори, вирус гепатита А и вирус парото-

тата. По несколько КП выявлены в таких парах вирусов как вирус гепатита С—полиовирус, вирус гепатита С—вирус денге, вирус паротита—вирус денге, вирус паротита — ВИЧ 1, вирус кори—вирус гепатита А, вирус Эбола—вирус гепатита А.

Что касается распространенности аутоКП длиной в 21 нуклеотид с уровнем комплементарности ≥ 18 нуклеотидов, то лишь в геноме ВТОРС, вирусов краснухи и гепатита С их несколько, а у остальных по 1 либо 0. Однако аутоКП меньшей длины (< 18 нуклеотидов) были многочисленны у всех исследованных вирусов, что предполагает, с одной стороны, наличие у вирусов разветвленной вторичной структуры онРНК, и, с другой стороны, возможной способности РНК дуплексироваться при репликации.

Обсуждение

Роль вРНК рассматривалась неоднократно в обширных обзорах в разных аспектах [5, 11, 19], и в обсуждении полученных нами результатов будут затронуты другие аспекты их возможных функций. Выявленные в настоящем исследовании в геномах вирусов 3 категории последовательностей — аутоКП, ГП и КП — потенциально

могут играть роль в различных процессах жизненного цикла вирусов и соответственно влиять на течение инфекционного процесса, который они вызывают у человека. Так аутоКП и КП, в дополнение к точечным мутациям, коротким делециям и вставкам в геноме вируса, способны обеспечить внутригеномную рекомбинацию между разными его штаммами и обеспечивать тем самым более быстрый (скачкообразный) механизм изменчивости вируса, резко изменяя его патогенность и антигенность. Обновленная антигенность будет проявляться в случае сдвига рамки транслирования нового фрагмента генома, обретенного в результате рекомбинации, на 1–2 нуклеотида. Многочисленность коротких аутоКП и КП в геномах вирусов, в частности у вирусов с онРНК, позволяет формировать множество вариантов дуплексов между геномами при инфекции клетки, при этом результатом рекомбинации может быть как приобретение его генами новых фрагментов либо утраты в них отдельных фрагментов. Хотя редким, но возможным событием могло бы быть участие аутоКП и КП в РНК/РНК-рекомбинации, приводящей к реактивации дефектных персистирующих вирусов, в частности вирусных штаммов, используемых в живых

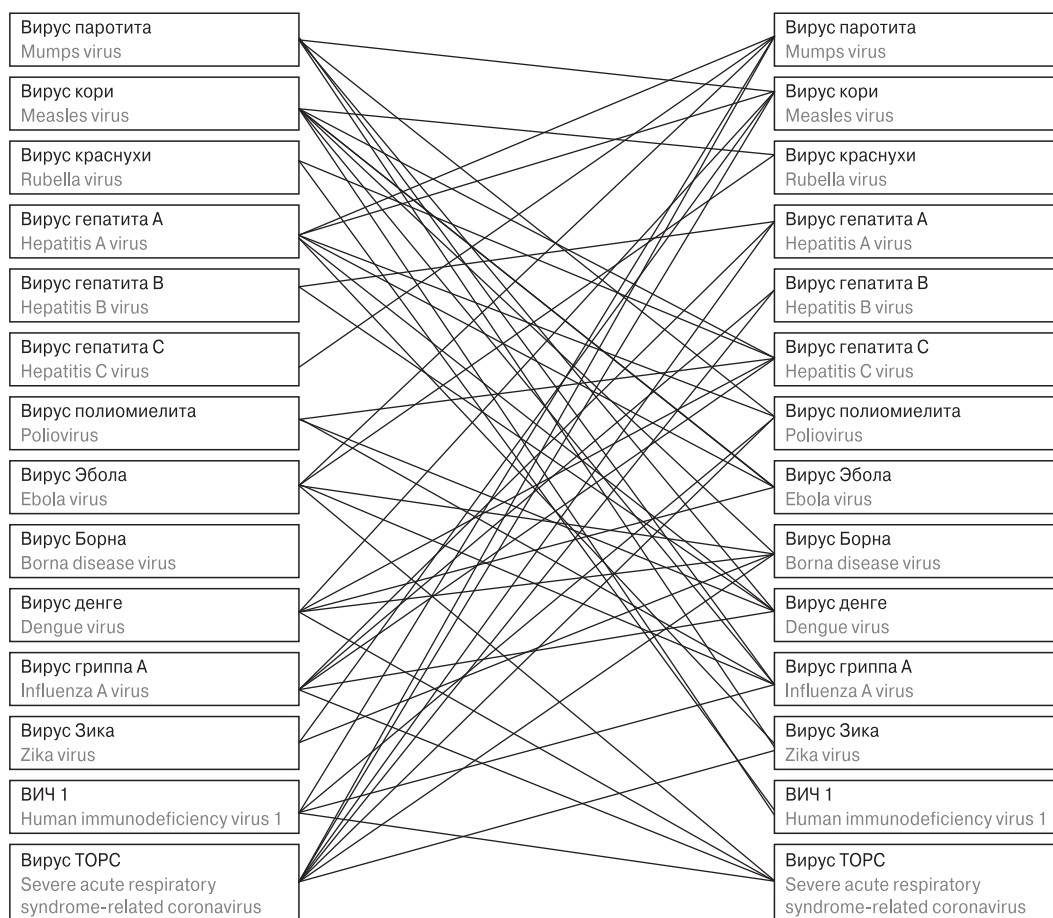


Рисунок 3. Схема связности вирусов по наличию в их геномах комплементарных последовательностей

Figure 3. Connection scheme of viruses according to the presence of complementary sequences in their genomes

A T G A C T A C T T G G T C T C T A C A C • • • G A C T G A T G A T C C A G A G A T C T G	(11626–11644) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (2161–2143) Вирус гепатита В / Hepatitis B virus
C T C T T G T G C A A C C T G T G G G T G • • • A A G A A C A C G T T G G T A A C C C A C	(9292–9310) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (7153–7135) Вирус паротита / Mumps virus
A T C T G C C A A C A A T G T G T G A T A • • • T A G A C A G G T G T T A C A C A C T C T	(14745–14763) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (3177–3159) Вирус Зика / Zika virus
G C G G T C A G A T C G T T G G T G G A G • • C A C C A G T C T A G G A A C C A C C T C	(420–438) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus (3380–3362) Полиовирус / Poliovirus
T A T C A T C T T C C T C T T C A T C C T • • • A C A G T A G A G A G A G A A G T A G G A	(395–413) Вирус гепатита В / Hepatitis B virus (4408–4390) Вирус Денге / Dengue virus
A T C T T A C T C T C T C A A G G A G A A • • • T A G A A G G A G A T G G T T C C T C T T	(10080–10098) Вирус паротита / Mumps virus (4479–4461) Вирус Зика / Zika virus
A A T T A A A A T T T A C C C C T G C A A • • T T C T T T T T A A A T G G G G A T G T T	(12353–12371) Вирус паротита / Mumps virus (7429–7411) Полиовирус / Poliovirus
G C A C A T G T A A T A C T T G C C C A G • • C G T G T A C T T T A T G A A C A G G T C	(11632–11650) Вирус паротита / Mumps virus (14505–14487) Вирус Эбола / Ebola virus
A T C T G T G A A T G T A A A C T C C A A • • • T C G A C A C G T A C A T T T G A G G G T	(5969–5987) Вирус паротита / Mumps virus (9707–9689) Вирус кори / Measles virus
G T T C A A C A G C A A C A A C C T G C T • • C A A G T T G T C G T T A G T G G A C G T	(1405–1423) Вирус паротита / Mumps virus (4822–4804) Вирус Денге / Dengue virus
A C T G G G G A T C T T C T T C G T C T T • A G A C C C C T A G A A G A A G C A G G A	(6645–6663) Вирус Зика / Zika virus (1328–1310) Вирус Борна / Borna disease virus
G C C C C A C C T C T G G C T T G C G G • • • C G G G A G T C G A G A T C G A A C G C C	(3902–3920) Вирус краснухи / Rubella virus (13401–13383) Вирус кори / Measles virus
C C T G T C A C T C T C T C C A G C T T C • • • A G A C A G A G A G A G A G G T G G A A G	(2016–2034) Полиовирус / Poliovirus (7995–7977) ВИЧ 1 / Human immunodeficiency virus 1
G G C T G A T G A T T T C C A G C A A G A • • • C A G A C T A C T A A A G C T C T T T C T	(9658–9676) Вирус Эбола / Ebola virus (7204–7186) Вирус Борна / Borna disease virus
A C A G C A C A T A T C T T T C C T T G C • • • T G T T C T G T A T A G A A A C T A A C G	(14891–14909) Вирус Эбола / Ebola virus (4881–4863) Вирус гепатита А / Hepatitis A virus
G G T T T G T T C C T G A C A C C G G C C • • C C A A A T A A G G A C G G T G G C C G G	(3157–3175) Вирус кори / Measles virus (3749–3731) Вирус Борна / Borna disease virus

Рисунок 4 (1-й фрагмент, окончание на с. 401). Комплементарные фрагменты геномов вирусов

Figure 4 (1st part, last part see on page 401). The complementary fragments of virus genomes

Примечание. В скобках указана позиция фрагмента в геномной РНК или ДНК.

Note. In parenthesis the position of the fragment in genome RNA or DNA is presented.

A C A T T T T T T T G T C T A T T C A A A . . . T G T T A A A A A C A G G T T A G T T T	(11713–11731) Вирус кори / Measles virus
A G G T G G A T C T C C T C T A C G C A T . . . T C C A T C T A G A G G A G A A G A G T A	(7049–7031) Вирус гепатита А / Hepatitis A virus
A G G T G G A T C T C C T C T A C G C A T . . . T C C A T C T A G A G G A G A A G A G T A	(1743–1761) Вирус Борна / Borna disease virus
T G G G C A T C C A T G T T G C T G G A G . . . A C C C G G A G G T A C A A C C A C T T C	(6150–6132) Вирус денге / Dengue virus
T G G G C A T C C A T G T T G C T G G A G . . . A C C C G G A G G T A C A A C C A C T T C	(5852–5870) Вирус гепатита А / Hepatitis A virus
A A T G C T T A T T A T A T T T T G G T T . . T T A C C A A T A A T A G A A A C C A A	(9422–9404) Вирус денге / Dengue virus
A A T G C T T A T T A T A T T T T G G T T . . T T A C C A A T A A T A G A A A C C A A	(12706–12724) Вирус ТОРС / Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus
T T C C T T C T G G C C C T G C T C T C T . . . A A C T A A G A A C G G G A C G A G A G A	(29–11) Вирус гриппа А, ген NA / Influenza A virus, NA gene
T T C C T T C T G G C C C T G C T C T C T . . . A A C T A A G A A C G G G A C G A G A G A	(869–887) Вирус гепатита С / Hepatitis C virus
G T T T T T G C C T T C T G A C T T C T T . . . T A A A A A C G G C A G A C T C A A G A A	(514–496) Вирус гриппа А, ген PA / Influenza A virus, PA gene
G T T T T T G C C T T C T G A C T T C T T . . . T A A A A A C G G C A G A C T C A A G A A	(1952–1970) Вирус гепатита В / Hepatitis B virus
G T T T T T G C C T T C T G A C T T C T T . . . T A A A A A C G G C A G A C T C A A G A A	(2271–2253) Вирус гриппа А, ген PB1 / Influenza A virus, PB1 gene

Рисунок 4 (окончание). Комплементарные фрагменты геномов вирусов

Figure 4 (last part). The complementary fragments of virus genomes

вакцинах. Напоминанием о возможности такого сценария служит известный печальный пример с живой полиомиелитной вакциной. Использование живых гриппозных вакцин также таит опасность реверсирования вакцинальных штаммов в дикие. Оно может реализоваться по давно обсуждаемому механизму, согласно которому РНК-зависимая РНК-полимераза, скользящая в процессе репликации по одной нити РНК, может переместиться (неоднократно) на другую комплексированную с ней нить РНК, обеспечивая обмен генетическими фрагментами между реплицируемыми нитями РНК [15]. Очевидно, что успех и частота рекомбинации между штаммами будет определяться уровнем консервативности аутоКП и КП в их геномах.

Поскольку онРНК-содержащие вирусы имеют множество аутоКП, что позволяет формировать их геномам различные варианты фолдинга и асимметричные из них дуплексы, то при заражении организма даже одним вирионом может развиваться хронический инфекционный процесс с репликацией множества вариантов генома заразившего организм вириона, в которых делеции и вставки будут порождены по упомянутому механизму смены матрицы РНК-зависимой РНК-полимеразой. Такой сценарий не исключен при ВИЧ-инфекции, поскольку в 70–80% случаев достаточно одного вириона либо инфицированной им клетки, для того чтобы установилась продуктивная клиническая инфекция, и вторгшийся в организм вирион вскоре эволюционирует в разные подтипы [9].

Если аутоКП хорошо объяснима изменчивостью подтипов вируса, то при коинфекции КП между разными вирусами (с онРНК) позволяют реализовать между ними РНК/РНК рекомбина-

цию по механизму смены матрицы репликации, даже если геномы вирусов разной полярности, что является наикратчайшим путем создания многообразия вирусов в эволюции. Заметим, что эволюция вирусов служит убедительным примером того, что природа не роскошествует своими ресурсами и принцип экономии действовал при создании их многообразия. Характерно, что на уровне бактерий преобладают бактериофаги с двуспиральной ДНК, а на уровне эукариот и особенно млекопитающих преобладает распространенность вирусов с онРНК, причем численность вирусов с (+)онРНК намного выше таковой у вирусов с (–)онРНК. Почему такая разница? Во-первых, «материальные» и временные затраты на воспроизведение ДНК-содержащих вирусов выше, чем на вирусы с онРНК. Во-вторых, создание многообразия РНК-содержащих вирусов и проще, и быстрее у вирусов с онРНК обеих полярностей. В-третьих, преобладание численности вирусов с (+) онРНК над вирусами с другим типом нуклеиновой кислоты можно было бы объяснить временным преимуществом — их геном при попадании в клетку может прямо функционировать как мРНК.

Существование в вирусных геномах обеих полярностей как аутоКП, так и КП, позволяющих реализоваться механизму смены матрицы репликации, сыграло, по-видимому, решающую роль в возникновении многообразия их представителей, например в минус-геномных семействах порядка *Mononegavirales* или плюс-геномном семействе *Picornaviridae*, отличающихся однотипностью организации порядка генов в их геномах и варьированием размеров генов и выраженной гомологией их РНК-зависимых РНК-полимераз. Помимо участия КП в форми-

ровании многообразия вирусов в процессе эволюции, в случае вирусов, имеющих фрагментарный геном и множество КП между фрагментами их геномов, КП могли бы служить как факторы, обеспечивающие при сборке вирионов комплектацию полным набором их генов, например в случае вируса гриппа.

Обнаружение ГП среди РНК-содержащих вирусов подтверждает существование в природе множественной глубокой рекомбинации среди вирусов [8, 10, 17], которая могла бы происходить при коинфицировании ими человека или в других общих для них хозяевах. Не следует полагать, что наличие в геномах вирусов ГП обязательно отображается в гомологичные пептидные последовательности тех белков вирусов, на гены которых приходится соответствующие ГП, так как рамка считывания рекомбинированных фрагментов может быть сдвинута на 1 или 2 нуклеотида и ГП в геноме могут соответствовать совершенно несходные последовательности пептидных фрагментов. Поэтому судить о происхождении белков только по сравнению их первичных структур было бы недостаточно. В случае же отсутствия сдвига рамки считывания рекомбинированных фрагментов генов у разных вирусов, в соответствующих белках, функции которых совершенно различны, могут быть выявлены гомологичные или даже идентичные гептапептиды, что может послужит дополнительным источником полиреактивности антител и ошибок иммунодиагностики [2, 3]. По существу распространенность ГП в геномах вирусов предполагает наличие пептидного континуума родства белков вирусов [2]. Кодированные ГП гептапептиды могут составлять «ядро» эпитопов, узнаваемых обоими классами главного комплекса гистосовместимости, и быть причиной гетерологичного иммунитета, под которым понимается феномен реактивации вторым неродственным вирусом Т-клеток памяти, генерированных в ответ на ранее перенесенную инфекцию другим (первым) вирусом, содержащим в его белках гомологичные ко второму вирусу эпитопы [16]. Проявление гетерологичного иммунитета может быть двояким. Если индуцированные вторым вирусом антитела либо эффекторные CD8 Т-лимфоциты к первому вирусу обладают протективным эффектом против самого второго вируса, то они ослабят либо вовсе заблокируют развитие инфекционного процесса у пациента, а при слабой их аффинности индуцируемая ими реактивация иммунной системы лишь усилит ее повреждающее действие на организм, обуславливая более тяжелое течение инфекции, вызванной вторым вирусом.

В практическом аспекте заслуживают внимательного изучения проявления взаимного гетерологичного иммунитета при инфицировании детей вирусами кори и паротита, поскольку белки этих вирусов содержат даже длинные идентичные последовательности. Известно, что аттенуирован-

ная коревая вакцина обладает протективным эффектом, уменьшая заболеваемость и смертность от неродственных патогенов [6]. Наличие множества ГП между вирусом кори и к вирусу паротита может послужить перспективой для создания пептидной, рекомбинантной или генной вакцины, активной против них обоих. Поскольку наиболее крупные РНК-содержащие вирусы (ВТОРС, вирусы Эбола и паротита) отличаются наиболее высоким содержанием ГП к другим вирусам, и, следовательно, имеют наиболее представительный набор иммунных эпитопов, родственных таковым у разных вирусов, то, имея в виду способность вакцин вызывать гетерологичные эффекты, было бы интересно проследить, как вакцинация против вирусов Эбола и паротита ассоциируется у иммунизированных лиц с противостоянием к другим неродственным инфекциям и появлением в их адаптивной иммунной системе клеток, реактивных к их возбудителям.

ГП и КП, образующиеся в процессе дегградации вирусной геномной или мРНК, либо транскрипты с них от одного вируса, связываясь с белками хозяина, могли бы блокировать репликацию, транскрипцию и трансляцию других вирусов при коинфекции, что можно рассматривать как проявление интерференции. Интерференция вирусов — широко распространенный феномен среди вирусов животных (первоначально был описан у бактериофагов) и определяется как взаимодействие вирусов, при котором происходит подавление одним вирусом репродукции другого вируса и изменение им инфекционного процесса посредством соучастия различных молекулярных механизмов [1]. При распространенности везикулярного транспорта молекул и даже вирионов из клетки в клетку коинфицирование одной и той клетки двумя разными вирусами могло бы быть нередким событием, однако встречается оно редко, что могло бы быть обусловлено существованием интерференции между вирусами, реализуемый через механизм, подобный системе CRISPR/Cas бактерий и архей. Не ясно, который из пары вирусов с ГП и КП будет доминирующим при коинфицировании, но очевидно то, что исход интерференции будет определяться множеством факторов и в их числе жизненный цикл вирусов, фолдинг и доступность их РНК и транскриптов с ГП и КП, не исключаяющими вовлеченность и гетерологичного иммунитета. К примеру, весь жизненный цикл вирус Борна протекает в ядре, а вирус гепатита С — в цитоплазме, то есть их жизненные циклы разобщены в клетке и наличие в их геномах ГП и КП может не проявиться в интерференции.

Как известно, существующая у бактерий и архей адаптивная защитная система CRISPR/Cas построена на механизме включения в их геном коротких фрагментов генома поражающих их вирусов и использования транскриптов с этих фрагментов для специфической посадки на геном вторгнувшегося вируса нуклеазы, расщепля-

ющей его [5, 7]. Открытие CRISPR/Cas свидетельствует о том, что способность распознавания «не-своего» и защита от него возникла уже на самых ранних этапах эволюции и представлена множеством механизмов. Этот эффективный и экономный принцип защиты от вирусной инфекции не был утрачен в эволюции эукариот. Он активно используется для регуляции транскрипции и трансляции и при том не только с участием малых РНК. Регуляторная роль РНК представлена сложной сетью взаимодействия различных типов РНК: кодирующими белок матричными РНК и некодирующими РНК (длинными некодирующими РНК, псевдогенами и циркуляторными РНК). Эти РНК-транскрипты выступают как конкурирующие эндогенные «губки» микроРНК: они сообщаются и регулируют друг друга, конкурируя за связывание с комплементарными к ним микроРНК. Открытые первоначально в клетках как регуляторы экспрессии генома и трансляции белков микроРНК циркулируют, как оказалось, в стабильной форме в разных жидкостях тела, включая кровь, и могут служить в качестве нового поколения патогенетических и прогностических биомаркеров [18].

Для аргументации возможной роли ГП и КП в интерференции обратимся к вирусам герпеса и краснухи, отличающимся среди всех известных организмов самым высоким процентом ГЦ в их геноме и влекущим два разных исхода при инфекции. Особенность вирусов группы герпеса – заселение ими почти каждого из нас после рождения на всю жизнь, и они не блокируемы инфицированием организма другими вирусами, что можно было бы объяснить отсутствием у других вирусов (из-за резкого отличия нуклеотидного состава их геномов) общих с вирусами герпеса ГП и КП. Вирус краснухи отличается от других исследованных нами вирусов отсутствием к большинству из них ГП и КП или наличием лишь минимума их к остальным вирусам и поражает почти каждого из нас в детстве или, реже, во взрослом состоянии, вызывая пожизненный иммунитет. Напрашивается предположение — вирусы с высоким процентом ГЦ в геноме вне конкуренции (интерферируют) с другими вирусами за инфицирование ими хозяина.

Завершая обсуждение распространенности ГП и КП геноме вирусов, нельзя не упомянуть в этой связи о коллизиях, которые они могли бы создать для методов диагностики природы вирусной инфекции, основанных на использо-

вании ПЦР. В случае совпадения праймера с ГП или КП диагностика с помощью ПЦР может привести к ложным результатам. Риск возникновения ошибок особенно велик для вирусов, характеризующихся множественностью и многократностью ГП и КП.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что биоинформатика позволяет анализировать одновременно множество вирусов на уровне и нуклеиновых кислот, и белков, выявляя новые данные, позволяющие сделать обобщающие выводы о происхождении и эволюции вирусов, которые невозможно извлечь экспериментально [8, 10, 17, 19], и по-новому взглянуть на существующие представления о вирусных инфекциях и последствиях вакцинации против них. Выявленная компьютерным анализом распространенность малых ГП и КП среди геномов разных вирусов человека можно рассматривать как результат многократной рекомбинации между ними, свершавшейся в прошлом и возможной в настоящем и определяющей их изменчивость и адаптацию. Чтобы ускользнуть от иммунной системы хозяина, природа наделила вирусы также способностью к молекулярной мимикрии. Она заключается в подгонке структуры белков вируса к структуре белков хозяина. Такая маскировка обеспечивает вирусу мир не только с надзирающей иммунной системой хозяина, но и большую совместимость его белков с клеточной средой, в которой он обитает, и многосторонняя генетическая рекомбинация наиболее быстро обеспечивает такую адаптацию вируса. Включение в геном вирусов ГП и КП не только обновляло их, но и могло бы служить и памятью о существовании конкурента (противника) за овладение хозяином, и средством противодействия конкуренту при коинфицировании, являясь аналогией системы CRISPR/Cas бактерий и архей. Не исключено, что ГП и КП, высвобождающиеся в результате деградации части реплицированных геномов или их мРНК, вовлечены и в другие функции в жизненном цикле вируса, тем самым давая основание предполагать, что и метаболизм вирусных компонентов является важным звеном для реализации инфекции. В аспекте полифункциональности можно также рассматривать и существование аутоКП. Помимо их возможной роли в рекомбинации внутритиповых штаммов, они могли бы через фолдинг геномов и мРНК быть регуляторами скорости трансляции вирусных белков, обеспечивая оптимальное количественное соотношение их для сборки вирионов.

Список литературы/References

1. Стент Г. Молекулярная биология вирусов и бактерий. М.: Мир, 1965. 467 с. [Stent G. Molekulyarnaya biologiya virusov i bakterii [Molecular biology of viruses and bacteria]. Moscow: Mir, 1965. 467 p.]
2. Харченко Е.П. Возможные коллизии в иммунодиагностике вирусных инфекций и вакцинации // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 157–164. [Kharchenko E.P. Immune epitope continuum of the protein relationships, poly- and autoreactivity of antibodies. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 157–164. doi: 10.15789/2220-7619-20162-157-164 (In Russ.)]

3. Харченко Е.П. Иммуноэпитопный континуум родства белков и полиреактивность и аутореактивность антител // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 4. С. 335–346. [Kharchenko E.P. Immune epitope continuum of the protein relationships, poly- and autoreactivity of antibodies. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 4, pp. 335–346. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-335-346 (In Russ.)]
4. Aguiar E.R., Olmo R.P., Marques J.T. Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host–pathogen interactions. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2016, vol. 7, iss. 6, pp. 824–837. doi: 10.1002/wrna.1361
5. Barrangou R. CRISPR–Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2013, vol. 4, iss. 3, pp. 267–278. doi: 10.1002/wrna.1159
6. Gil A., Kenney L.L., Mishra R., Watkin L.B., Aslan N., Selin L.K. Vaccination and heterologous immunity: educating the immune system. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2015, vol. 109, no. 1, pp. 62–69. doi: 10.1093/trstmh/tru198
7. Heler R., Marraffini L.A., Bikard D. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR–Cas immune systems. *Mol. Microbiol.*, 2014, vol. 93, iss. 1, pp. 1–9. doi: 10.1111/mmi.12640
8. Jachiet P.A., Colson P., Lopez P., Baptiste E. Extensive gene remodeling in the viral world: new evidence for nongradual evolution in the mobilome network. *Genome Biol. Evol.*, 2014, vol. 6, iss. 9, pp. 2195–2205. doi: 10.1093/gbe/evu168
9. Keele B.F., Giorgi E.E., Salazar–Gonzalez J.F., Decker J.M., Pham K.T., Salazar M.G., Sun C., Grayson T., Wang S., Li H., Wei X., Jiang C., Kirchherr J., Gao F., Anderson J., Ping L., Swanstrom R., Tomaras G., Blattner W., Goepfert P., Kilby J., Saag M., Delwart E., Busch M., Cohen M., Montefiori D., Haynes B., Gaschen B., Athreya G., Lee H., Wood N., Seoighe C., Perelson A., Bhattacharya T., Korber B.T., Hahn B., Shaw G. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 21, pp. 7552–7557. doi: 10.1073/pnas.0802203105
10. Koonin E., Dolja V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*, 2015, vol. 479–480, pp. 2–25. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.039
11. Li M.L., Weng K.F., Shih S.R., Brewer G. The evolving world of small RNAs from RNA viruses. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2016, vol. 7, iss. 5, pp. 575–588. doi: 10.1002/wrna.1351
12. Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2016, vol. 7, iss. 5, pp. 637–660. doi: 10.1002/wrna.1356
13. Perez J.T., Zlatev I., Aggarwal S., Subramanian S., Sachidanandam R., Kim B., Manoharan M., ten Oever B.R. A small-RNA enhancer of viral polymerase activity. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 24, pp. 13475–13485. doi: 10.1128/JVI.02295-12
14. Perez J.T., Varble A., Sachidanandam R., Zlatev I., Manoharan M., Garcia-Sastre A., ten Oever B.R. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 25, pp. 11525–11530. doi: 10.1073/pnas.1001984107
15. Romanova L.I., Blinov V.M., Tolskaya E.A., Viktorova E.G., Kolesnikova M.S., Guseva E.A., Agol V.I. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*, 1986, vol. 155, no. 1, pp. 202–213.
16. Selin L.K., Wlodarczyk M.F., Kraft A.R., Nie S., Kenney L.L., Puzone R., Celada F. Heterologous immunity: immunopathology, autoimmunity and protection during viral infections. *Autoimmunity*, 2011, vol. 44, pp. 328–347.
17. Stedman K.M. Deep recombination: RNA and ssDNA virus genes in DNA virus and host genomes. *Annu. Rev. Virol.*, 2015, vol. 2, pp. 203–217. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055127
18. Tay Y., Rinn J., Pandolfi P.P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*, 2014, vol. 505, no. 7483, pp. 344–352. doi: 10.1038/nature12986
19. Tycowski K.T., Guo Y., Lee N., Moss W.N., Vallery T.K., Xie M., Steitz J.A. Viral noncoding RNAs: more surprises. *Genes. Dev.*, 2015, vol. 29, pp. 567–584.
20. Umbach J.L., Yen H.L., Poon L.L., Cullen B.R. Influenza A virus expresses high levels of an unusual class of small viral leader RNAs in infected cells. *MBio*, 2010, vol. 1, no. 4: e00204-10. doi: 10.1128/mBio.00204-10

Автор:

Харченко Е.П., д.б.н., ведущий научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Author:

Kharchenko E.P., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.08.2016
Принята к печати 16.10.2017

Received 05.08.2016
Accepted 16.10.2017

ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА

Н.С. Гребенкина, Н.А. Контаров, Н.В. Юминова

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

Резюме. Известно, что функционирование многих белков и ферментов зависит от степени гидратации их поверхностей. В наших исследованиях в качестве модели поверхностного антигенного вирусного белка была выбрана нейраминидаза (NA) вируса гриппа. С помощью модели адсорбции Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ) рассчитаны величины монослоя воды (a_m) при различных значениях упругости паров воды. Из полученных изотерм БЭТ можно сделать вывод о наличии гистерезиса, заключающегося в различном значении монослоя a_m при сорбции и десорбции воды с поверхности фермента, что связано, вероятно, с высокой степенью кооперативности образующейся гидратной оболочки. Максимальное связывание молекул воды наблюдалось при значении упругости паров $p/p_s = 0,65$ и составило $a_m = 224$ молекулы воды на одну молекулу фермента. При сопоставлении с расчетной площадью поверхности тетрамера NA ($S = 256 \text{ нм}^2$) и учитывая максимальную площадь проекции молекулы воды можно сделать вывод о полном покрытии монослоем воды всей поверхности фермента. При данном значении a_m наблюдалась максимальная активность NA, минимум активности фермента приходился при значении $a_m = 98$ молекул воды на молекулу фермента, что соответствовало значению упругости паров воды $p/p_s = 0,38$. Таким образом, для NA вируса гриппа показана зависимость ферментативной активности от степени гидратации поверхности фермента. Получена зависимость иммуногенности вируса гриппа от степени гидратации NA.

Ключевые слова: степень гидратации, нейраминидаза, модель адсорбции Брунауэра–Эммета–Теллера, иммуногенность вируса гриппа.

THE STUDY OF INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE HYDRATION DEGREE

Grebyonkina N.S., Kontarov N.A., Yuminova N.V.

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

Abstract. It is known that the functioning of many proteins and enzymes depends on the degree of hydration of their surfaces. In our studies, neuraminidase (NA) of influenza virus was selected as a model for surface antigenic viral protein. The Brunauer–Emmett–Teller (BET) model of adsorption was used to calculate the values of water monolayer (a_m) at different values of water vapor pressure. The obtained BET isotherms allow for concluding that hysteresis takes place manifested by the difference between the monolayer a_m values for sorption and desorption of water from the surface of the enzyme, which is probably associated with a high degree of cooperation of the hydration shell formed. The maximum binding of water molecules was observed for the vapor pressure p/p_s value of 0.65 and was $a_m = 224$ water molecules per a molecule of the enzyme. Basing on the calculated surface area of a NA tetramer ($S = 256 \text{ nm}^2$) and the maximum projection area of water molecule, it may be concluded that the entire surface of the enzyme is completely covered with a water monolayer. For said a_m value the maximum activity of NA was observed, whereas the minimum enzyme activity corresponded to the a_m value of 98 water molecules per a molecule of the enzyme, which corresponded to the water vapor pressure p/p_s value of 0.38. Thus, for the influenza virus NA protein a dependency of the enzymatic activity on the degree of hydration of the surface of the enzyme is demonstrated. The dependence of immunogenicity of influenza virus from the extent of hydration of NA.

Key words: hydration degree, neuraminidase, Brunauer–Emmett–Teller adsorption model, immunogenicity of influenza virus.

Адрес для переписки:

Контаров Николай Александрович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: (495) 674-01-99 (служебн.).
E-mail: kontarov@mail.ru

Contacts:

Nikolai A. Kontarov
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazennyi lane, 5a,
I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-01-99 (office).
E-mail: kontarov@mail.ru

Библиографическое описание:

Гребенкина Н.С., Контаров Н.А., Юминова Н.В. Изучение степени гидратации нейраминидазы вируса гриппа // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 405–408. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-405-408

Citation:

Grebyonkina N.S., Kontarov N.A., Yuminova N.V. The study of influenza virus neuraminidase hydration degree // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 405–408. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-405-408

Введение

Взаимодействие между биологическими макромолекулами имеет важное функциональное значение. Стабильность различных белковых структур зависит от величины контактных площадок, комплементарности центров взаимодействия, характера межмолекулярных сил, возникающих при образовании комплексов, а также от процесса вытеснения части воды, связываемой свободными компонентами комплексов [1].

При определенной степени гидратации белковой молекулы не происходит образования ассоциатов вирусных белков, что имеет непосредственное значение при получении, например, различных противовирусных вакцин. Так, в процессе очистки вакцинного препарата белковые ассоциаты могут оседать на поверхности фильтра, что приводит к снижению специфической активности вирусного препарата. Излишняя или недостаточная гидратация может приводить к маскировке результатов при учетывании нейраминидазы (NA) активности. На сегодняшний день практически полностью отсутствуют данные о влиянии гидратации вирусных белков на их структурно-функциональные свойства. Поэтому целью данной работы было изучение структурно-функционального состояния NA ви-

руса гриппа при различных степенях гидратации белковых молекул и изучение влияния степени гидратации фермента NA на его активность [2, 3].

Материалы и методы

Препарат белка. NA вируса гриппа выделяли из концентрированного и очищенного вируса гриппа A/Victoria/361/2011 (серотип H3N2). С этой целью вирусы ресуспендировали в Na-ацетатном буфере (50 мМ ацетат Na, 2 мМ NaCl, 0,2 мМ ЭДТА; pH = 7,0) и разрушали 7% октилглюкозидом в течение 2 ч при +4°C. Затем материал центрифугировали при 15 000 об./мин в течение 1 ч (ротор Beckman SW50.1). К супернатанту, содержащему NA, добавляли 2%-ный водный раствор бромида цетримония (Sigma, Германия) до конечной концентрации 0,1%. Образец наносили на анионообменную колонку (1 × 3 см, сорбент DEAE Sephadex A-50), предварительно уравновешенную стартовым буфером (50 мМ Трис-HCl, 0,1% октилглюкозид, pH = 7,2). NA элюировали 30 мл стартового буфера. Каждую фракцию диализовали против буфера STE в течение 72 ч для удаления остатков октилглюкозида. Контроль чистоты выделенного материала осуществляли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS по методу Лэммли (концентрация ПААГ 10%, сила тока при входе в гель 50 мА, далее 80 мА, время проведения — 40 мин) [4] с последующим анализом гелей на денситометре GS-700 (Bio-Rad Laboratories) (рис. 1).

Лиофилизация NA. Сконцентрированный материал разливали по 2 мл в биовials объемом 4 мл, замораживали при -80°C и лиофилизировали в течение 12 ч.

Гидратирование NA измеряли при температуре 25°C на весах Мак-Бена в интервале относительной упругости паров воды 0,38÷0,65. Для измерения изотерм использовали NA (~150 мг), имеющую после длительного вакуумирования при 25°C и 10⁻⁴ мм рт.ст. постоянный вес [5].

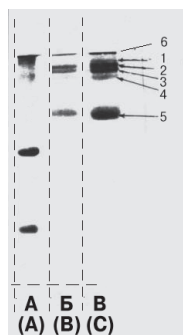


Рисунок 1. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле

Figure 1. The results of electrophoresis in polyacrylamide gel

A — электрофореграмма неочищенного вирусосодержащего материала; Б — электрофореграмма вирусосодержащего материала после очистки и концентрирования белкового кольца в градиенте сахарозы; В — электрофореграмма вирусосодержащего материала после очистки и концентрирования белкового осадка в градиенте сахарозы. 1 — Р-белки (PB1, PB2, PA); 2 — нейраминидаза; 3 — гемагглютинин; 4 — NP-белок; 5 — М-белок; 6 — белковый маркер масс.

A — The electrophoretogram of not purified virus containing material; B — The electrophoretogram virus containing material after purification and concentration of protein rings in the gradient of sucrose; C — The electrophoretogram virus-containing material after purification and concentration of the protein precipitate in a gradient of sucrose. 1 — P-proteins (PB1, PB2, PA); 2 — neuraminidase; 3 — hemagglutinin; 4 — NP-protein; 5 — M-protein; 6 — protein mass marker.

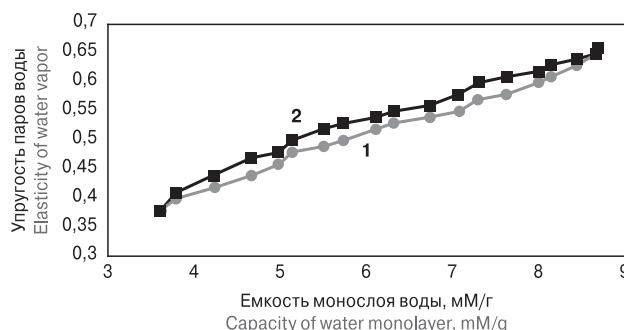


Рисунок 2. Изотерма сорбции и десорбции паров воды NA вируса гриппа

Figure 2. The isotherm of adsorption and desorption of water vapor NA of influenza virus

1 — изотерма сорбции; 2 — изотерма десорбции.
1 — isotherm sorption; 2 — isotherm desorption.

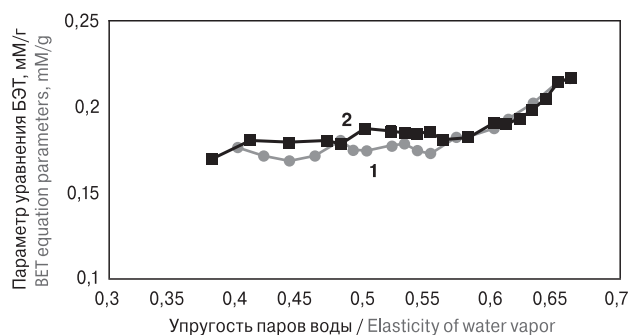


Рисунок 3. Линейная анаморфоза изотермы сорбции и десорбции паров воды NA вируса гриппа в координатах уравнения БЭТ

Figure 3. Linear anamorphosis of the isotherms of sorption and desorption of water vapor NA of influenza virus in the coordinates of equation BET
1 — линейная анаморфоза изотермы сорбции в координатах уравнения БЭТ; 2 — линейная анаморфоза изотермы десорбции в координатах уравнения БЭТ.
1 — linear anamorphosis sorption isotherms in coordinates of equation BET; 2 — linear anamorphosis desorption isotherms in coordinates of equation BET.

Активность NA определяли по методу [6]. Готовили реакционную смесь (0.1 мл очищенной NA и 0.1 мл фетуина в 0,2 М фосфатном буфере с pH = 6,0). Смесь тщательно перемешивали и инкубировали 2 ч при 35°C. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 0,1 мл периодатного реагента, перемешивали и инкубировали 20 мин при 25°C. К смеси добавляли 1 мл арсенитного реагента и перемешивали до растворения осадка. К смеси добавляли 2,5 мл тиобарбитуратного реагента, перемешивали и помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения к смеси добавляли 4 мл бутанолового реагента (N-бутанол, содержащий 5% по объему концентрированной соляной кислоты) и интенсивно встряхивали для лучшей экстракции окрашенного вещества. Смесь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин при 25°C. Отбирали водную (нижнюю) фазу и определяли на спектрофотометре величину поглощения при длине волны 549 нм с соответствующим контролем. Оптимальное поглощение составляло 0,58 оптической единицы. Полученный результат сопоставляли с калибровочной кривой (с концентрацией N-ацетилнейраминовой кислоты от 5 до 40 мкг (в 0,2 мл 0,2 М фосфатного буфера, pH = 6,0). Иммуногенность вируса гриппа определялась по РТГА [9].

Результаты и обсуждение

По полученным данным были построены изотермы сорбции-десорбции паров воды (рис. 2), а также их линейные анаморфозы в координатах уравнения Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ) (рис. 3).

Как видно из графика (рис. 2), максимальное связывание молекул воды наблюдалось при зна-

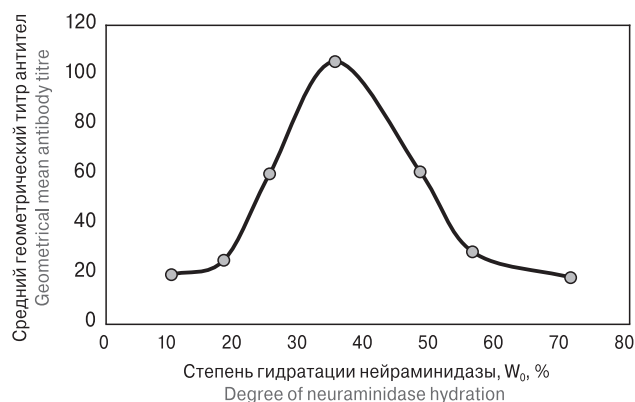


Рисунок 4. Зависимость среднего геометрического титра антител от степени гидратации нейраминидазы вируса гриппа A/Victoria/361/2011 (серотип H3N2)

Figure 4. The dependence of the average geometric titers of antibodies to the degree of hydration of the neuraminidase of influenza virus A/Victoria/361/2011 (H3N2 serotype)

чении упругости паров $p/p_s = 0,65$ и составило 8,66 мМ воды на 1 г NA, что соответствует 224 молекулам воды на 1 молекулу фермента. Минимальное связывание молекул воды наблюдалась при значении упругости паров воды 0,38 и составило 3,6 мМ воды на 1 г NA. При сопоставлении с расчетной площадью (S) тетрамера NA ($S = 256 \text{ нм}^2$) [7] и учитывая максимальную S проекции молекул воды можно сделать вывод о полном покрытии монослоем воды всей поверхности фермента.

Также видно, что изотермы сорбции и десорбции паров воды не совпадают, что связано с явлением гистерезиса, заключающегося в различном значении монослоя a_m при сорбции и десорбции паров воды с поверхности фермента NA в виду высокой степени кооперативности образующейся гидратной оболочки.

С помощью линейных анаморфоз (рис. 3) были рассчитаны параметры уравнения БЭТ. Из полученных данных можно сделать вывод, что величина a_m (емкость монослоя) соответствует совокупности молекул воды, связанных в первую очередь теми центрами, которые имеют большую энергию сорбции, по сравнению с энергией связанной воды, завершающих образование гидратной оболочки.

При анализе линейных анаморфоз была рассчитана теплота сорбции, равная 3,4 кДж/моль.

Теплоту сорбции рассчитывали по формуле [10]:

$$Q = RT \ln C,$$

где Q — теплота сорбции, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура в Кельвинах, C — параметр модели БЭТ.

Из полученного значения видно, что результат теории сходен с экспериментальными данными по гидратации белков [8].

Поэтому можно сделать вывод, что процесс сорбции обратимый, сопровождается выделением тепла, называемого теплотой сорбции, которое тем больше, чем прочнее связь между молекулами сорбента и сорбата.

Максимальная активность фермента NA вируса гриппа наблюдалась при значении $a_m = 224$ молекулы паров воды на 1 молекулу фермента, а минимум активности NA соответствовал $a_m = 98$ молекул паров воды на молекулу фермента, что соответствовало значению упругости паров воды 0,38. Таким образом, для нейраминидазы вируса гриппа показана зависимость ферментативной активности от степени гидратации поверхности фермента.

Степень гидратации оказывает также влияние на иммуногенность вируса гриппа, что является важным при получении различных противогриппозных вакцин. Нами получена зависимость среднего геометрического титра антител от степени гидратации нейраминидазы вируса гриппа A/Victoria/361/2011 (серотип H3N2) (рис. 4). Данная зависимость имеет экстремум в виде максимума при степени гидратации $W_0 = 35\%$, что практически соответствует значению $a_m = 235$ молекул паров воды на 1 молекулу фермента, при котором наблюдался максимум активности нейраминидазы. Полученный результат указывает на необходимость учета гидратации нейраминидазы вируса гриппа при получении вакцинных препаратов.

Список литературы/References

1. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. М.: Институт компьютерных исследований. 2004. 212 с. [Aksenov S.I. Voda i ee rol' v regulyatsii biologicheskikh protsessov [Water and its role in the regulation of biological processes]. Moscow: Institute of Computer Science, 2004, 212 p.]
2. Вирусология. Методы: пер. англ. Под ред. Мейхи Б.М.: Мир, 1988. 344 с. [Barrett T., Bird P., Clegg J. Virusologiya. Metody. Pod red. Meikhi B. [Virology. Methods. Ed. Meikhi B.]. Moscow: Mir, 1988, 344 p.]
3. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. Пер. с англ., 2-е изд. М.: Мир. 1984. 306 с. [Greg S., Sing K. Adsorbtsiya, udel'naya poverkhnost', poristost' [Absorption, specific surface, porosity]. 2nd ed. Moscow: Mir. 1984, 306 p.]
4. Лихтенштейн Г.И. Закономерности в энтропийных и энергетических свойствах ферментативных процессов // Биофизика. 1966. Т. 19. С. 562–575. [Likhtenshtein G.I. Regularities in the entropic and energy properties of enzymatic processes. *Biofizika = Biophysics*, 1966, vol. 19, pp. 562–575. (In Russ.)]
5. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики гриппа: методические указания (МУ 3.3.2.1758-03). М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора МЗ РФ. 2005. 44 с. [Metody opredeleniya kachestva immunobiologicheskikh preparatov dlya profilaktiki grippa: metodicheskie ukazaniya (MU 3.3.2.1758-03). [Methods for determining the quality of immunobiological preparations for the prevention of influenza: guidelines (MU 3.3.2.1758-03)]. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2005. 44 p.]. URL: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4727 (29.09.2017)
6. Остарман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука. 1981. 288 с. [Ostarman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinovyx kislot: Elektroforez i ul'tratsentrifugirovanie (prakticheskoe posobie) [Research methods proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifuge forces (practical guide)]. Moscow: Science, 1981, 288 p.]
7. Туроверов К.К., Кузнецова И.М. Собственная УФ-флуоресценция белков как инструмент для изучения их динамики // Цитология. 1998. Т. 40, № 8–9. С. 735–746. [Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. Own UV-fluorescence of proteins as a tool for studying their dynamics. *Tsitologiya = Cytology*, 1998, vol. 40, no. 8–9, pp. 735–746. (In Russ.)]
8. Хургин Ю.И., Росляков В.Я., Клячко-Гурвич А.Л., Бруева Т.Р. Адсорбция паров воды химотрипсинов и лизоцимом // Биохимия. 1972. № 37. С. 485–492. [Khurgin Yu.I., Roslyakov V.Ya., Klyachko-Gurvich A.L., Brueva T.R. Adsorption of water vapor of chymotrypsins and lysozyme. *Biokhimiya = Biochemistry*, 1972, no. 37, pp. 485–492. (In Russ.)]
9. Frauenfelder H., Petsko G. A., Tsernoglou D. Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, 1979, vol. 280, pp. 558–565. doi: 10.1038/280558a0
10. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. Structure of influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1983, vol. 303, pp. 35–40.

Авторы:

Гребенкина Н.С., младший научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Контаров Н.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Юминова Н.В., д.б.н., доцент, зам. директора по науке ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Grebinkina N.S., Junior Researcher, Laboratory of the Children's Viral Infections, I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kontarov N.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of the Children's Viral Infections, I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Yuminova N.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director of Research, I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.05.2017
 Отправлена на доработку 02.06.2017
 Принята к печати 25.08.2017

Received 02.05.2017
 Revision received 02.06.2017
 Accepted 25.08.2017

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В ЛПМО ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

А.В. Мартынова^{1,2}, А.Ю. Горькая¹, В.Л. Абашина³, Л.М. Семейкина³

¹ Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

² ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия

³ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, г. Владивосток, Россия

Резюме. Проблема профилактики и лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), остается актуальной и трудноразрешимой в современной медицине. Способность формирования устойчивых к антибиотикам и высоковирулентных госпитальных штаммов, адаптирующихся еще и к применяемым в лечебных учреждениях дезинфицирующим средствам и развитие инновационных высокотехнологичных методов диагностики и лечения при широком распространении микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью определяют необходимость непрерывного совершенствования эпидемиологического надзора и микробиологического мониторинга данной группы инфекций. Цель работы: провести эпидемиологический анализ заболеваемости ИСМП в Приморском крае и определить удельный вес внутрибольничных инфекций (ВБИ), возникших в хирургических стационарах и отделениях ЛПМО, в общей структуре ИСМП. *Материал и методы.* В работе использовались данные из статистической формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» в Приморском крае. Метод исследования — ретроспективный эпидемиологический анализ. *Результаты.* В 2015 г. в Приморском крае зарегистрировано 159 случаев ИСМП, показатель заболеваемости составил 0,05 на 1000 пролеченных пациентов. В сравнении с 2014 г. заболеваемость снизилась, темп снижения составил — 28%. По данным статистической отчетности наибольшее количество случаев ИСМП выявлено в родовспомогательных учреждениях — 60 случаев (38% от всех ВБИ), в детских стационарах — 46 (29%) и в хирургических стационарах и отделениях — 33 (21%). Остальные ИСМП зарегистрированы в амбулаторно-поликлинических учреждениях и в учреждениях терапевтического профиля. Отмечается некоторая тенденция к росту удельного веса ВБИ в хирургических стационарах и отделениях ЛПМО: 15% в 2012 г., 14% в 2013 г., 17% в 2014 г. и 21% от всех случаев ИСМП в 2015 г. В структуре ИСМП на территории Приморского края в 2015 г., как и в предыдущие годы, доминировали острые кишечные инфекции (35 случаев — 22%) и гнойно-септические инфекции у новорожденных (34 случая — 21%). *Выводы.* На территории Приморского края ИСМП чаще всего регистрируются в родовспомогательных учреждениях, в детских и хирургических стационарах и отделениях. Отмечается тенденция к росту удельного веса ИСМП в хирургических стационарах и отделениях ЛПО, вероятнее всего, не вследствие увеличения случаев послеоперационных осложнений, а за счет других нозологий.

Ключевые слова: госпитальные инфекции, постинъекционные осложнения, инфекции мочевыводящего тракта, гнойно-септические инфекции, внутрибольничные инфекции, эпидемиология внутрибольничных инфекций.

Адрес для переписки:

Мартынова Алина Викторовна
690002, Россия, г. Владивосток, ул. Острякова, 2,
Тихоокеанский государственный медицинский университет.
Тел.: +8 914 701-69-08 (служебн.).
E-mail: clinmicro@yandex.ru

Contacts:

Alina V. Martynova
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakova str., 2,
Pacific State Medical University.
Phone: +7 914 701-69-08 (office).
E-mail: clinmicro@yandex.ru

Библиографическое описание:

Мартынова А.В., Горькая А.Ю., Абашина В.Л., Семейкина Л.М.
Эпидемиологические аспекты заболеваемости внутрибольничными
инфекциями в ЛПМО хирургического профиля в Приморском крае //
Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 409–412. doi: 10.15789/2220-
7619-2017-4-409-412

Citation:

Martynova A.V., Gorkavaya A.Yu., Abashina V.L., Semeikina L.M.
Epidemiology aspects of hospital-acquired infection morbidity in health
surgery hospitals in Primorsky region // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 409–412.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-409-412

EPIDEMIOLOGY ASPECTS OF HOSPITAL-ACQUIRED INFECTION MORBIDITY IN HEALTH SURGERY HOSPITALS IN PRIMORSKY REGION

Martynova A.V.^{a,b}, Gorkavaya A.Yu.^a, Abashina V.L.^c, Semeikina L.M.^c

^a Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^b Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^c Center of Hygiene and Epidemiology, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The problem of prophylaxis and treatment of the hospital-acquired infections caused remains actual and urgent and stubborn in modern medicine. Appearance of antimicrobial agents resistant and high virulent strains adapting also to disinfectants. Development of innovative hi-tech diagnostic methods and treatment at wide circulation of microorganisms with multiple antimicrobial agents resistance defines need of continuous improvement of epidemiological surveillance and microbiological monitoring of this group of infections. Aim of project: to carry out the epidemiological analysis of a case rate of hospital-acquired infections in Primorsky Krai and to determine the specific role of hospital-acquired infections which arose in surgical hospitals and units. Material and methods: In work there were used statistical forms, e.g. No. 2 «The information on infectious and parasitic diseases» in Primorsky Krai. A research method — the retrospective epidemiological analysis. Results of a research: In 2015 in Primorsky Krai there were registered 159 cases of hospital-acquired infections, the indicator of a case rate made 0.05 per 1000 treated patients. In comparison with 2014 the case rate decreased, rate of depression made — 28%. According to the statistical reporting the greatest number of cases of hospital-acquired infections was registered in obstetrical institutions — 60 cases (38% of all hospital-acquired infections), in children's hospitals — 46 (29%) and in surgical hospitals and units — 33 (21%). Other hospital-acquired infections are registered in out-patient and polyclinic institutions and in institutions of a therapeutic profile. In structure of hospital-acquired infections in the territory of Primorsky Krai in 2015, as well as in previous years, acute intestinal infections dominated (35 cases — 22%) and it is purulent — septic infections at newborns (34 cases — 21%). Conclusions: In the territory of Primorsky Krai the hospital-acquired infections are often registered in obstetrical institutions, in children's and surgical hospitals and units. The tendency to hospital-acquired infections morbidity growth in surgical hospitals and units, most likely, not owing to augmentation of cases of postoperative complications, and at the expense of other nosologies.

Key words: hospital-acquired infections, injection complications, infections of the urinary tract, purulent-septic infection, nosocomial infection, epidemiology of nosocomial infections.

Проблема профилактики и лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), остается актуальной и трудно-разрешимой в современной медицине. Несмотря на многочисленные научные исследования и усилия практического здравоохранения, учет и регистрация инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (внутрибольничных инфекций), до сих пор недостаточны: в 51 субъекте Российской Федерации регистрируются не все виды внутрибольничных инфекций, в том числе отсутствует регистрация внутрибольничных инфекций мочеполовой системы, послеоперационных и постинъекционных инфекций [4, 5]. Более того, актуальны и такие причины, как случаи поздней изоляции заболевших, сокращение внутрибольничной заболеваемости, несвоевременное начало противоэпидемических мероприятий, нарушение правил содержания функциональных помещений, несоблюдение требований асептики и антисептики при работе со стерильным материалом, при гнойно-септических инфекциях — высокий уровень носительства золотистого стафилококка среди сотрудников на фоне перегрузки учреждений родовспоможения выше нормативной мощности [1–3, 6, 8]. Обеспечение снижения внутрибольничной заболеваемости является одной из приоритетных задач в целях обеспечения са-

нитарно-эпидемиологического благополучия населения [4]. Частота ИСМП зависит от многих факторов, один из которых — тип стационара или отделения лечебно-профилактической организации (ЛПО). Хирургический стационар в этом плане является объектом наибольшего риска инфицирования пациента. Другой проблемой эпидемиологии ИСМП в стационарах хирургического профиля является проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов, что приводит к социальным и экономическим потерям [7, 9–11]. Способность формирования устойчивых к антибиотикам и высоковирулентных госпитальных штаммов, адаптирующихся еще и к применяемым в лечебных учреждениях дезинфицирующим средствам и развитие инновационных высокотехнологичных методов диагностики и лечения при широком распространении микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью определяют необходимость непрерывного совершенствования эпидемиологического надзора и микробиологического мониторинга данной группы инфекций.

Цель работы: провести эпидемиологический анализ заболеваемости ИСМП в Приморском крае и определить удельный вес внутрибольничных инфекций (ВБИ), возникших в хирургических стационарах и отделениях ЛПО, в общей структуре ИСМП.

Материалы и методы

В работе использовались данные из статистической формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» в Приморском крае. Метод исследования — ретроспективный эпидемиологический анализ.

Результаты

В 2015 г. в Приморском крае зарегистрировано 159 случаев ИСМП, показатель заболеваемости составил 0,05 на 1000 пролеченных пациентов. В сравнении с 2014 г. заболеваемость снизилась, темп снижения составил 28%. По данным статистической отчетности наибольшее количество случаев ИСМП выявлено в родовспомогательных учреждениях — 60 случаев (38% от всех ВБИ), в детских стационарах — 46 (29%) и в хирургических стационарах и отделениях — 33 (21%). Остальные ИСМП зарегистрированы в амбулаторно-поликлинических учреждениях и в учреждениях терапевтического профиля. Отмечается некоторая тенденция к росту удельного веса ВБИ в хирургических стационарах и отделениях ЛПО: 15% в 2012 г., 14% в 2013 г., 17% в 2014 г. и 21% от всех случаев ИСМП в 2015 г. В структуре ИСМП на территории Приморского края в 2015 г., как и в предыдущие годы, доминировали острые кишечные инфекции (35 случаев — 22%) и гнойно-септические инфекции у новорожденных (34 случая — 21%). Второе и третье место заняли инфекции органов дыхания и дыхательных путей и гнойно-септические инфекции у родильниц (18 и 16% соответственно). Инфекции, связанные с оперативным вмешательством, зарегистрированы в 12% (18 случаев). Остальные ИСМП приходятся

на постинъекционные инфекции; инфекции мочевыводящих путей на протяжении последних лет в Приморском крае не регистрировались. В многолетней динамике наблюдается некоторое снижение удельного веса послеоперационных осложнений в структуре ИСМП: 20% в 2010 г., 29% в 2011 г., 15% в 2012 г., 12% в 2013 г., 11% в 2014 г. и 12% в 2015 г. Показатель заболеваемости инфекциями, связанными с оперативным вмешательством, составил 0,36 (2014 г. — 0,3; 2013 г. — 0,2) на 1000 оперированных больных. Послеоперационные осложнения в ЛПО регистрировались на восьми территориях Приморского края: в городах Арсеньев, Артем, Находка, Владивосток, Спасск-Дальний, в районах Кавалеровский, Кировский и Чугуевский. На остальных территориях на протяжении многих лет отсутствует учет и регистрация заболеваемости ИСМП.

Выводы

На территории Приморского края ИСМП чаще всего регистрируются в родовспомогательных учреждениях, в детских и хирургических стационарах и отделениях. Отмечается тенденция к росту удельного веса ИСМП в хирургических стационарах и отделениях ЛПО, вероятнее всего, не вследствие увеличения случаев послеоперационных осложнений, а за счет других нозологий. В связи с отсутствием учета ИСМП на многих территориях Приморского края регистрируемый уровень заболеваемости ИСМП, в том числе и в хирургических стационарах, не в полной мере отражает его истинное положение и нуждается в дальнейшем изучении с разработкой комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Список литературы/References

- Афони́на И.А., Краева Л.А., Ценева Г.Я. Характеристика чувствительности *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* к противомикробным препаратам и коллоидному серебру // Инфекция и иммунитет. 2011, Т. 1, № 2. С. 177–180. [Afonina I.A., Kraeva L.A., Tseneva G.Ya. Characteristic of sensitivity of staphylococcus aureus and candida albicans to antibacterial preparations and colloidal silver. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 2, pp. 177–180. doi: 10.15789/2220-7619-2011-2-177-180 (In Russ.)]
- Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Логвиненко С.М. Клинико-патогенетическое значение бета-лактамазной активности сыворотки больных и здоровых лиц // Военная медицина. 2011. Т. 21, № 4. С. 40–44. [Zhiltsov I.V., Veremey I.S., Semenov V.M., Logvinenko S.M. Clinical and pathogenicity beta-lactamase activity of serum from patients and health. *Voennaya meditsina = Military Medicine*, 2011, vol. 21, no. 4, pp. 40–44. (In Russ.)]
- Марченко А.Н., Мefодьев В.В. Многолетняя динамика заболеваемости внутрибольничными инфекциями в Тюменской области // Медицинская наука и образование Урала. 2012, Т. 13, № 4. С. 119–121. [Marchenko A.N., Mefodyev V.V. Longstanding dynamics of morbidity of nosocomial infections in Tyumen State. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of Ural*, 2012, vol. 13, no. 4, pp. 119–121. (In Russ.)]
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014: State report]. URL: http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf (28.09.2017).
- Омарова С.М., Моллаева А.М., Алиева А.И., Саидова П.С., Алиева С.Ф., Касумова А.М. Спектр и антибиотикорезистентность возбудителей внутрибольничного инфицирования операционных ран и органов мочевыделительной системы у хирургических больных // Клиническая лабораторная диагностика. 2015, Т. 60, № 5. С. 45–48.

- [Omarova S.M., Mollaeva A.M., Alieva A.I., Saidova P.S., Alieva S.F., Kasumova A.M. Spectrum and antimicrobial agents resistance of pathogens contaminating operation wounds and organs of urinary tract in surgery patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 5, pp. 45–48. (In Russ.)]
6. Свистунов С.А., Кузин А.А., Суборова Т.Н., Жарков Д.А. Опыт применения микробиологических исследований при инфекционных осложнениях тяжелых травм // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 373–378. [Svistunov S.A., Kuzin A.A., Suborova T.N., Zharkov D.A. Microbiological methods application experience in the severe injuries infectious complications. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 373–378. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-373-378 (In Russ.)]
 7. Чарушина И.П. Сравнительный анализ микобиоты стационаров различного профиля // Проблемы медицинской микологии. 2015. Т. 17, № 1. С. 47–51. [Charushina I.P. Comparative analysis of the mycobiota of various profile hospitals. *Problemy meditsinskoj mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 47–51. (In Russ.)]
 8. Ягодина А.Ю., Пегушина О.Г., Маслов Ю.Н., Серова И.А., Наумов С.А. Антибиотикорезистентность изолятов, выделенных в кардиохирургическом стационаре от пациентов с сахарным диабетом и ВИЧ-инфекцией // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 37–43. [Yagodina A.Y., Pegushina O.G., Maslov Y.N., Serova I.A., Naumov S.A. Antibiotic resistance of the bacteria isolates obtained from the patients with diabetes and HIV-infected patients in cardiosurgical hospital. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 37–42. doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-37-42 (In Russ.)]
 9. Gade S.S., Nørskov-Lauritsen N., Ridderberg W. Prevalence and species distribution of *Achromobacter* sp. cultured from cystic fibrosis patients attending the Aarhus centre in Denmark. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 5, pp. 686–689. doi: 10.1099/jmm.0.000499
 10. Karlowsky J.A., Hoban D.J., Hackel M.A., Lob S.H., Sahn D.F. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013–2015. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 1, pp. 61–69. doi: 10.1099/jmm.0.000421
 11. Mohamed E.R., Aly S.A., Halby H.M., Ahmed S.H., Zakaria A.M., El-Asheer O.M. Epidemiological typing of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, which causes paediatric ventilator-associated pneumonia in Egypt. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 5, pp. 628–634. doi: 10.1099/jmm.0.000473

Авторы:

Мартынова А.В., д.м.н., профессор, профессор Школы естественных наук Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток, Россия; профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;

Горькая А.Ю., к.м.н., доцент Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток, Россия;

Абашина В.Л., врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии, г. Владивосток, Россия;

Семейкина Л.М., зам. заведующего отделом эпидемиологии ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Martynova A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of Natural Science School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology and Military Epidemiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Gorkavaya A.Yu., PhD (Medicine), Associate Professor, Biomedical School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation;

Abashina V.L., Epidemiologist, Department of Epidemiology, Center of Hygiene and Epidemiology, Vladivostok, Russian Federation;

Semeikina L.M., Deputy Head of the Department of Epidemiology, Center of Hygiene and Epidemiology, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.05.2017
Отправлена на доработку 15.06.2017
Принята к печати 26.07.2017

Received 25.05.2017
Revision received 15.06.2017
Accepted 26.07.2017

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *K. ОХУТОСА*

Г.Р. Садртдинова

Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования, связанные с повышением эффективности выделения фагов бактерий вида *K. oxytoca*, за счет разработки оптимального состава среды, используемой в работе. В научных исследованиях практически во всех методиках, связанных с выделением бактериофагов, в качестве питательной основы используются мясопептонный бульон и мясопептонный агар. Особенности роста и культивирования микроорганизмов создают определенные сложности для выделения фагов, активных в отношении бактерий вида *K. oxytoca*. Подбор компонентов и создание среды, которая обеспечивала бы оптимальный рост как бактериальной культуры, так и репродукции вируса позволяет облегчить работу по выделению бактериофагов. Число бактериальных штаммов, используемых в работе — 7. Все штаммы культур получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина. Исследования включали в себя 2 основных этапа. Первый этап включал выделение бактериофагов из внешней среды по методике Адельсона Л.И., Ляшенко Е.А. Материалом для исследований были пробы почвы, сточных вод, фекалий (2) — всего 4 пробы. Согласно выбранной методике, высеив предполагаемого фаголизата осуществляли на мясопептонный агар (1,5%) и предлагаемый нами агар для выделения бактериофагов (АФ) (1,5%). Положительным результатом считали наличие на среде негативных колоний, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий. Отрицательным результатом — сплошной рост («газон») бактериальной культуры. В качестве контроля использовали посев изучаемого микроорганизма на данные среды. В ходе проводимых исследований по первому этапу было выделено 2 бактериофага, активных в отношении искомого вида микроорганизма. Второй этап заключался в сравнительном анализе показателей культивирования выделенных фагов на стандартном мясопептонном агаре и предлагаемой среде для выделения бактериофагов. Также были определены основные биологические свойства изучаемых фагов: морфология негативных колоний, литическая активность, специфичность. Образовавшиеся на сравниваемых средах негативные колонии отнесли к одному типу. Литическая активность изучаемых фагов на мясопептонном агаре и среде АФ была одинаковой. По Грация 2×10^7 БОЕ/мл для бактериофага КО-3 УГСХА, $(3-4) \times 10^8$ БОЕ/мл для бактериофага КО-8724 УГСХА. Выделенные бактериофаги не проявили литическую активность в отношении штаммов гетерогенных культур (*Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp.).

Ключевые слова: бактерии, бактериофаги, выделение, метод, морфология, литическая активность.

K. OXYTOCA BACTERIOPHAGES ISOLATION METHODS IMPROVEMENT

Sadrtdinova G.R.

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk region, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of a study related to increasing the efficiency of phage isolation of bacteria of the species *K. oxytoca*, by developing the optimal composition of the medium used in the work. In scientific research, in al-

Адрес для переписки:

Садртдинова Гузелия Рафиковна
433430, Россия, Ульяновская область, Чердаклинский район,
пос. Октябрьский, ул. Студенческая, 8, Ульяновская ГСХА
им. П.А. Столыпина.
Тел.: 8 (953) 981-47-99.
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

Contacts:

Guzeliia R. Sadrtdinova
433430, Russian Federation, Ulyanovsk region, Cherdaklinskii
district, Oktjabrskii village, Studencheskaia str., 8, Ulyanovsk State
Agricultural Academy named after P.A. Stolypin.
Phone: +7 (953) 981-47-99.
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

Библиографическое описание:

Садртдинова Г.Р. Усовершенствование методов выделения
бактериофагов *K. oxytoca* // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4.
С. 413–418. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-413-418

Citation:

Sadrtdinova G.R. *K. oxytoca* bacteriophages isolation methods
improvement // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 413–418. doi: 10.15789/2220-7619-2017-
4-413-418

most all methods associated with the isolation of bacteriophages, meat-peptone broth and meat-peptone agar are used as the nutrient basis. The peculiarities of growth and cultivation of microorganisms create certain difficulties for the isolation of phages active against bacteria of the species *K. oxytoca*. The selection of components and the creation of an environment that would ensure the optimal growth of both the bacterial culture and the reproduction of the virus makes it possible to facilitate the isolation of bacteriophages. The number of bacterial strains used in the work was 7. All strains of cultures were obtained from the Museum of the Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary and Sanitary Expertise of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin". The studies included 2 main stages. The first stage consisted in isolation of bacteriophages by the method of isolation from the external environment by the method of Adelson L.I., Lyashenko E.A. The material for the studies were samples: soil, sewage sample, fecal samples (2). Only 4 samples. According to the chosen method, the sowing of the putative phagolysate was carried out on meat-peptone agar (1.5%) and the agar for isolating bacteriophages (Aph) (1.5%). A positive result was the presence on the environment of negative colonies, clearly visible on the matt background of deep growth of bacteria. A negative result is a continuous growth ("lawn") of bacterial culture. As a control, the culture of the microorganism studied was used for the media. In the course of the conducted studies for the first stage, 2 bacteriophages were isolated, active against the desired species of microorganism. The second stage consisted in a comparative analysis of the indices of cultivation of the isolated phages on standard meat-peptone agar and the proposed medium for isolation of bacteriophages. The main biological properties of the phages studied were also determined: morphology of negative colonies, lytic activity, specificity. The negative colonies formed on the compared media were classified as one type. The lytic activity of the studied phages on meat-peptone agar and Aph medium was the same. According to Grazia 2×10^7 BOE/ml for bacteriophage KO-3 UGSHA, $(3-4) \times 10^8$ BOE/ml for bacteriophage KO-8724 UGSHA. The isolated bacteriophages showed no lytic activity against strains of heterogeneous crops (*Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp.).

Key words: *bacteria, bacteriophages, isolation, method, morphology, lytic activity.*

Введение

Один из способов борьбы с патогенными бактериями — использование бактериофагов. Исследования биологических свойств бактериофагов, выполненные с момента их получения, позволили широко использовать эти вирусы бактерий для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, молекулярной биологии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологии. Поэтому процесс изучения вирусов прокариот, характеризовавшийся вначале как узкая область медицинской микробиологии, в настоящее время приобрел общебиологическое значение [4].

Выделением и изучением бактериофагов *Klebsiella* занимались разные научные школы, как в нашей стране, так и за рубежом. Активная работа в этой области проводилась отечественными, польскими и венгерскими учеными (Przondo-Hessek, 1966; Slopek et al., 1967; 1978; Габрилович с соавт., 1970, 1973, 1981, 1983; Gaston et al., 1987; Pieroni et al., 1994; Джапаридзе с соавт., 2005; Васильев Д.А. с соавт., 2001–2016).

Бактерии вида *K. oxytoca* занимают следующее (по числу вызываемых заболеваний) место после *K. pneumoniae* место. В норме данный микроорганизм встречается в желудочно-кишечном тракте, на коже и слизистой оболочке дыхательных путей человека. Микроорганизм

является причиной острых кишечных заболеваний молодняка животных и птиц. Следовательно, получение специфических фагов, активных в отношении бактерий данного вида, является актуальным [2].

В методиках, связанных с выделением бактериофагов, основным питательным субстратом служит мясопептонный агар. В состав данной среды входит: пептон, экстракт мясной, натрия хлорид, агар-агар. Показатель pH среды ($7,4 \pm 0,2$). Данная величина pH для бактерий изучаемого вида не всегда является оптимальной. Оптимальная величина для бактерий вида *K. oxytoca* pH опт = 7,2.

Цель исследования заключалась в оптимизации результатов выделения бактериофагов бактерий *K. oxytoca*, за счет модификации среды культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы изучаемого вида микроорганизма: *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 2, *K. oxytoca* 3, *K. oxytoca* 24, *K. oxytoca* 25, *K. oxytoca* 26.

Нами предложена следующая пропись среды, которую планируется использовать при работе с бактериофагами (АФ-агар для выделения бактериофагов): пептон (источник необходимых аминокислот), дрожжевой экстракт (источник витаминов и микроэлементов), натрия хлорид (для поддержания нормального осмотического

баланса), агар-агар (в качестве загустителя среды, для поддержания необходимой плотности). Конечное значение рН ($7,1 \pm 0,1$).

Предложенный нами вариант среды (по количественным составляющим) может быть видоизменен в последующих исследованиях.

Первая серия опытов включала в себя получение бактериофагов методом выделения из внешней среды [1, 6].

Вторая серия опытов заключалась в проверке сравнительных показателей культивирования выделенных фагов на стандартном мясопептонном агаре и предлагаемой нами среде для выделения бактериофагов. Особое внимание обращали на морфологию образованных негативных колоний, их литическую активность (сохранение активности), специфичность (сходность) [4, 5].

Результаты

Образцы для исследования: проба почвы, проба сточных вод, пробы фекалий (2). Всего 4 пробы. В колбу, содержащую стерильный мясопептонный бульон в количестве 50 мл, вносили 10 мл исследуемого материала и по 0,5 мл всех изучаемых штаммов бактерий *K. oxytoca* — *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 2, *K. oxytoca* 3, *K. oxytoca* 24, *K. oxytoca* 25, *K. oxytoca* 26. Таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам бактерий *K. oxytoca*. Данную колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 3 сут при 37°C. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали.

Одну часть надосадочной жидкости обрабатывали хлороформом (в разведении 1:10), а вторую прогревали на водяной бане при 60°C в течение 30 мин. Мясопептонный агар (1,5%) и агар для выделения бактериофагов (АФ) (1,5%) предварительно разливали в чашки Петри и высушивали в течении 1–2 дней в условиях термостата. После этого в пробирку с 2,5 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45°C агара вносят 0,5 мл исследуемого центрифугата и 0,2 мл суточной культуры. Содержимое пробирок быстро перемешивали и выливали на изучаемые плотные среды. Посевы инкубировали при 37°C. Учет результатов проводили через 18–20 ч. Положительным результатом считали наличие на среде негативных колоний, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий, отрицательным — сплошной рост («газон») бактериальной культуры. В качестве контроля использовали посев изучаемого микроорганизма на данные среды.

Результаты исследований, связанные с выделением бактериофагов, представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 позволяют заключить, что из внешней среды нами было выделено 2 бактериофага:

- бактериофаг КО-3 УГСХА — бактериофаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca* 3;
- бактериофаг КО-8724 УГСХА — бактериофаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca* ATCC 8724.

Стоит отметить, что из пробы № 1 наличие негативных колоний фиксировали только на среде АФ — бактериофаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca* 3.

Таблица 1. Результаты выделения бактериофагов *K. oxytoca* из объектов внешней среды

Table 1. Results of isolation of *K. oxytoca* bacteriophages from environmental objects

Исследуемый штамм The investigated strain	Исследуемая проба Test sample							
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4	
	МПА NA	АФ APh	МПА NA	АФ APh	МПА NA	АФ APh	МПА NA	АФ APh
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	–	–	–	–	+	+	–	–
<i>K. oxytoca</i> 1	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 2	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 3	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 24	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 25	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 26	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» — наличие негативных колоний, «–» — отсутствие негативных колоний.

Note: «+» — presence of negative colonies, «–» — absence of negative colonies.

Таблица 2. Морфология негативных колоний бактериофагов *K. oxytoca*Table 2. Morphology of negative colonies of bacteriophages *K. oxytoca*

Название фага Name of the phage	Питательная среда Nutrient medium					
	МПА NA			АФ APh		
	Величина колоний, мм Value of colonies, mm	Тип колоний A type of colonies	Характер негативных колоний The nature of negative colonies	Величина колоний, мм Value of colonies, mm	Тип колоний A type of colonies	Характер негативных колоний The nature of negative colonies
КО-3 УГСХА KO-3 UGSHA	0,5–1,0	II	мелкие, круглые, слабой прозрачности с неровными краями small, round, weak transparency with uneven edges	1,0–1,2	II	мелкие, круглые, прозрачные с ровными краями small, round, transparent with even edges
КО-8724 УГСХА KO-8724 UGSHA	0,5–1,0	II	мелкие, круглые, слабой прозрачности с неровными краями small, round, weak transparency with uneven edges	1,0–1,5	II	мелкие, круглые, прозрачные с ровными краями small, round, transparent with even edges

Морфологию негативных колоний изучали в разведении фагов 10^{-5} – 10^{-9} с индикаторной культурой на МПА и АФ в посевах методом агаровых слоев по Грациа. Учет проводили через 18 ч инкубации в термостате при температуре 37°C. Отмечали величину негативных колоний, форму, степень прозрачности, характер краев колоний, наличие и величину неполного лизиса (табл. 2).

Образовавшиеся на сравниваемых средах негативные колонии отнесли к одному типу (рис. 1, III обложка). Отметим количественные различия- на МПА негативных колоний было больше, чем на предлагаемой нами среде. Также отличия заключались в размере колоний и характере контура края. Так, на среде АФ бактериофаги образовывали негативные колонии величиной 1–1,5 мм, мелкие, круглые, прозрачные и с ровными краями. На МПА фаги отличались меньшим размером, более слабой прозрачностью колоний и неровным контуром края.

Определение специфичности бактериофагов проводили методом «стекающей капли». Изучение специфичности бактериофагов проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp. Для этого на поверхность МПА и АФ в чашках Петри наносили 0,4–0,5 мл 18-часовой

исследуемой культуры. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. После подсушивания газона культуры на поверхность среды наносили капли изучаемых бактериофагов и наклоняли чашки, чтобы капли стекли. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ (рис. 2, III обложка).

Выделенные бактериофаги не проявили литическую активность в отношении штаммов гетерогенных культур. На среде АФ «стекающая капля» отличалась более четкой зоной образованного лизиса.

Литическую активность бактериофага оценивали по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах. Активность по методу Аппельмана выражается максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема по методу Грациа.

Индикаторные культуры *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 3 выращивали на стандартном МПБ в течение 18–20 ч. Литическую активность бактериофагов определяли в жидких (по методу Аппельмана) и плотных (по методу Грациа) питательных средах.

Таблица 3. Литическая активность бактериофагов вида *K. oxytoca*Table 3. Lytic activity of bacteriophages of the species *K. oxytoca*

Название фага Name of the phage	Индикаторная культура Indicator culture	Питательная среда Nutrient medium	Активность фагов по Грациа Phage activity by Grazia
КО-3 УГСХА KO-3 UGSNA	<i>K. oxytoca</i> 3	МПА NA	2 × 10
		АФ APh	2 × 10
КО-8724 УГСХА KO-8724 UGSNA	<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	МПА NA	3 × 10 ⁸
		АФ APh	4 × 10 ⁸

Определение литической активности по методу Грациа (выражается числом фаговых корпускул в 1 мл). 1,5% МПА и АФ разливали по чашкам 20–30 мл. Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета (0,1 мл на каждые 100 мл МПА). Чашки подсушивали в термостате в течение 18–24 ч. Затем 1 мл фага (в разведении от 10⁻⁵ до 10⁻⁹) вносили в пробирки с 2,5 мл 0,7% агара, предварительно расплавленного и остуженного до 46–48°C, туда же добавляли 0,2 мл суточной бульонной культуры, смесь тщательно перемешивали, вращением пробирки в ладонях, и выливали на поверхность 1,5% агара, чашки для затвердения оставляли на столе на 30 мин, а затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18–24 ч. После инкубации подсчитывали количество негативных колоний фага и умножали полученное число на степень разведения (табл. 3).

Согласно результатам, представленным в таблице 3, активность изучаемых фагов на МПА и АФ была одинаковой.

Обсуждение

В ходе исследования нами был разработан состав среды, которую можно использовать в процессе выделения бактериофагов, активных в отношении *K. oxytoca*, и изучения их биологических свойств. Данная среда позволяет выделять бактериофаги с более крупными негативными колониями, с литической активностью, не хуже, чем на МПА.

Благодарности

Выражаем благодарность Научно-исследовательскому инновационному центру по микробиологии и биотехнологии» (г. Ульяновск) за финансовую поддержку проводимых исследований.

Список литературы/References

- Бульканова Е.А., Золотухин С.Н. Выделение бактериофагов рода *Klebsiella* из сточных вод // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2004. № 12. С. 40–42. [Bulkanova E.A., Zolotukhin S.N. Isolation of bacteriophages of the genus *Klebsiella* from wastewater. *Vestnik Ulyanovskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2004, no. 12, pp. 40–42. (In Russ.)]
- Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Садртдинова Г.Р. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2015. № 4 (32). С. 68–72. [Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Sadrtidinova G.R. Comparative effectiveness of methods of isolation of bacteriophages *Klebsiella oxytoca*. *Vestnik Ulyanovskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2015, no. 4 (32), pp. 68–72. (In Russ.)]
- Захаренко С.М. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее // Медицинский совет. 2013. № 10. С. 72–75. [Zakharenko S.M. Bacteriophages: present and future aspects of use. *Meditsinskii sovet* = *Medical Advice*, 2013, no. 10, pp. 72–75. (In Russ.)]
- Золотухин Д.С., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Семенов А.М., Романова Е.М. Выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов *Hafnia alvei* // Вестник ветеринарии. 2013. № 1 (64). С. 68–70. [Zolotukhin D.S., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Semenov A.M., Romanova E.M. The isolation, selection and observation of biological characteristics of *Hafnia alvei* bacteriophages. *Vestnik veterinarii* = *Herald of Veterinary Medicine*, 2013, no. 1 (64), pp. 68–70. (In Russ.)]

5. Катмакова Н.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Поиск и селекция псевдотуберкулезных бактериофагов // Ветеринарная медицина. 2009. № 4. С. 19–20. [Katmakova N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. The search and selection of bacteriophages *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Veterinarnaya meditsina = Veterinary Medicine*, 2009, no. 4, pp. 19–20. (In Russ.)]
6. Ляшенко Е.А., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Разработка и применение фагового биопрепарата для диагностики клебсиеллезной инфекции // Вестник ветеринарии. 2011. № 4 (59). С. 90–92. [Lyashenko E.A., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. Development and application of the bacteriophage for klebsiellos diagnosis. *Vestnik veterinarii = Herald of Veterinary Medicine*, 2011, no. 4 (59), pp. 90–92. (In Russ.)]

Автор:

Садртдинова Г.Р., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия.

Author:

Sadrtdinova G.R., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.07.2017
Отправлена на доработку 03.07.2017
Принята к печати 30.09.2017

Received 01.07.2017
Revision received 03.07.2017
Accepted 30.09.2017

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ЧИСТЯЩИЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПОВЕРХНОСТЕЙ КАК ВОЗМОЖНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА ТРАДИЦИОННЫМ ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

А.Г. Афиногенова^{1,2}, Л.А. Краева¹, Г.Е. Афиногенов², В.В. Веретенников¹

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

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

Резюме. Известно, что любые поверхности окружающей среды в лечебно-профилактических организациях являются резервуаром для микроорганизмов и способствуют передаче патогенов, увеличивая риск перекрестного загрязнения через опосредованный контакт с пациентом. Широкое и не всегда рациональное использование химических дезинфицирующих средств несет риски для безопасности окружающей среды, пациента и медицинского персонала. В связи с этим актуальным остается поиск альтернативных методов очистки и обеззараживания абиотических поверхностей в учреждениях здравоохранения. Тестировали средство для очистки помещений, содержащее 3 штамма бактерий рода *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*. Проводили обработку помещений медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера: процедурного кабинета (опыт) и кабинета врача-гинеколога (контроль с обычной уборкой и дезинфекцией). В течение 30 дней посев проб смывов с поверхностей производили на 3 чашки Петри с «кровяным» агаром на основе среды «агар Гивенталья–Ведьминой» истощающим штрихом (метод Гольда). Выделенные культуры бактерий идентифицировали с помощью микроскопии, биохимического типирования и MALDI-TOF MS (Bruker). В контроле и опыте в 1-й день наблюдения до начала уборки помещений высевали *Enterococcus faecium* 10⁴–10⁵ КОЕ/мл. До 2-го дня наблюдения в контроле преобладал *E. faecium*, затем его рост прекратился. На 2–4-й день наблюдали рост бактерий семейства *Enterobacteriaceae* до 10⁶ КОЕ/мл, в дальнейшем их количество составляло 10 КОЕ/мл до конца срока наблюдения (30 дней). С 5-го дня в контроле выявляли рост бактерий рода *Staphylococcus* spp., в основном *S. epidermidis*. В опыте со 2-го дня наблюдения выявляли достоверный рост *Bacillus* spp. на уровне 10⁵ КОЕ/мл, затем до конца срока эксперимента их количество составляло 10²–10³ КОЕ/мл. В 1–2-й день выявляли рост *E. faecium*, затем он прекратился. На 2–4-й день наблюдали рост бактерий семейства *Enterobacteriaceae* до уровня 10⁶ КОЕ/мл и на 8-й день — до 10² КОЕ/мл, в остальные дни рост условно-патогенной микробиоты отсутствовал. Средство для очистки помещений на основе пробиотиков — бактерий рода *Bacillus* — сдерживает рост санитарно-показательных микроорганизмов по сравнению с контролем. Таким образом, средства пробиотической очистки не обладают биоцидным действием, но, контаминируя поверхности, они подавляют рост и распространение условно-патогенных бактерий.

Ключевые слова: пробиотики, пробиотическая очистка, химические дезинфектанты, очистка поверхностей, устойчивость патогенов к дезинфектантам.

Адрес для переписки:

Афиногенова Анна Геннадьевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-86-31 (служебн.); 8 921 557-88-94 (моб.).
E-mail: spbtestcenter@mail.ru

Contacts:

Anna G. Afinogenova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-86-31 (office); +7 921 557-88-94 (mobile).
E-mail: spbtestcenter@mail.ru

Библиографическое описание:

Афиногенова А.Г., Краева Л.А., Афиногенов Г.Е., Веретенников В.В. Пробиотические чистящие средства для поверхностей как возможная альтернатива традиционным дезинфектантам // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 419–424. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-419-424

Citation:

Afinogenova A.G., Kraeva L.A., Afinogenov G.E., Veretennikov V.V. Probiotic-based sanitation as alternatives to chemical disinfectants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 419–424. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-419-424

PROBIOTIC-BASED SANITATION AS ALTERNATIVES TO CHEMICAL DISINFECTANTSAfinogenova A.G.^{a,b}, Kraeva L.A.^a, Afinogenov G.E.^b, Veretennikov V.V.^b^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. It is known that any surfaces in environment of healthcare organizations are a reservoir for microorganisms and contribute to transmission of pathogens, increasing the risk of cross-contamination through indirect contact with the patient. Wide and not always rational use of chemical disinfectants carries risks for the safety of the environment, the patient and medical staff. In this regard, there remains the search for alternative methods of purification and decontamination of abiotic surfaces in health care facilities. Tested the tool for cleaning areas that contain 3 strains of the genus *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*. Were treated areas of the medical centre in St. Petersburg Pasteur Institute: the treatment room (experience) and the office of the gynecologist (control with conventional cleaning and disinfection). Within 30 days of the sowing of samples of swabs from surfaces were made of 3 Petri dishes with the “blood” agar-based environment “agar of Givental–Witch” debilitating touch (gold method). Isolated cultures of bacteria identified by microscopy, biochemical typing and MALDI-TOF MS (Bruker). In control and the experience in the 1st day of observation prior to the cleaning sown *Enterococcus faecium* 10⁴–10⁵ CFU/ml. The 2nd day of observation in the control was dominated by *E. faecium*, then his growth stopped. For the 2nd–4th day watched the growth of Enterobacteriaceae to 10⁶ CFU/ml, in the future, the number was 10 CFU/ml until the end of the observation period (30 days). The 5th day in the control revealed the growth of bacteria of the genus *Staphylococcus* spp. mainly *S. epidermidis*. The experience from the 2nd day of observation revealed a significant increase in *Bacillus* spp. at 10⁵ CFU/ml, then before the end of the experiment, the number was 10²–10³ CFU/ml. In the 1st–2nd day revealed growth of *E. faecium*, and then it stopped. For the 2nd–4th day watched the growth of *Enterobacteriaceae* to the level of 10⁶ CFU/ml, on the 8th day – to 10² CFU/ml, the growth of conditionally pathogenic microflora was absent. Cleaning of the premises on the basis of probiotic bacteria of the genus *Bacillus* inhibits the growth of sanitary-indicative microorganisms compared to control. Thus, the means of probiotic treatment did not have a biocidal effect, but inhabiting the surface, they inhibit the growth and proliferation of opportunistic bacteria.

Key words: probiotics, probiotic sanitation, chemical disinfectants, surface sanitation, resistance of pathogens to disinfectants.

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются одним из наиболее частых осложнений, возникающих у пациентов и медицинского персонала в учреждениях здравоохранения и вызывающих беспокойство относительно безопасности и качества медицинских услуг во всем мире [4]. Европейский центр по контролю за заболеваниями подтвердил, что ИСМП являются главной проблемой здравоохранения в Европе с распространенностью в среднем 5,7% пациентов [11]. По данным Национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НП «НАСКИ»), ИСМП поражают 5–10% пациентов, находящихся в стационарах, и занимают десятое место в ряду причин смертности населения. Пациенты с ИСМП находятся в лечебных учреждениях в 2–3 раза дольше, чем аналогичные пациенты без признаков инфекции. Это является причиной роста стоимости лечения в 3–4, а риска летального исхода — в 5–7 раз. Экономический ущерб от ИСМП в Российской Федерации может достигать, как минимум, 10–15 млрд рублей в год. Эти инфекции значительно снижают качество жизни пациента, приводят к потере репутации учреждения здравоохранения. В России по данным официальной статистики ежегодно регистрируется примерно 30 тыс. случаев ИСМП (≈ 0,8

на 1000 пациентов), однако, по данным экспертов, их истинное число составляет не менее 2–2,5 млн человек [1].

До сих пор обсуждаемым вопросом является значение окружающей среды (ограниченного пространства и обстановки) для здоровья пациента в учреждениях здравоохранения, поскольку она является источником условно-патогенных микроорганизмов, в том числе возбудителей госпитальных инфекций, которые могут сохраняться и размножаться в различных увлажняющих устройствах, растворах для парентерального введения, некоторых антисептиках и дезинфектантах [1]. Известно, что любые поверхности являются резервуаром для микроорганизмов и способствуют передаче патогенов, увеличивая риск перекрестного загрязнения через опосредованный контакт с пациентом [14, 15]. Процедуры очистки и дезинфекции объектов окружающей среды нацелены на снижение подобных рисков для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия в учреждениях здравоохранения. Использование химических дезинфицирующих средств на территории Российской Федерации регламентировано нормативными документами и внутренними стандартами лечебных организаций, требования которых обязательны для исполнения, поскольку качественная дезинфекция поверхностей является важным

мероприятием для профилактики инфекций [8] и приводит к существенному сокращению числа случаев ИСМП [9].

При этом широкое и не всегда рациональное использование химических дезинфицирующих средств несет риски для безопасности окружающей среды, пациента и медицинского персонала. Микроорганизмы способны приспособляться ко множеству экологических, физических и химических условий, что приводит к развитию устойчивости к применяемым в стационарах антимикробным средствам, как лекарственным, так и к дезинфектантам и антисептикам [3]. В связи с этим актуальным остается поиск альтернативных методов очистки и обеззараживания абиотических поверхностей в лечебно-профилактических организациях.

Falagas & Makris в 2009 г. [12] предложили новый подход — использование непатогенных микроорганизмов, а именно пробиотиков, которые способны колонизировать твердые поверхности и противодействовать росту других видов бактерий согласно конкурентоспособному принципу исключения (закон Гэюза) [13]. Это понятие определяет биологическое регулирование численности микробов, когда рост одного вида бактерий является антагонистическим по отношению к росту другого патогенного микроорганизма. Как полагают авторы некоторых исследований, основным препятствием, ограничивающим использование пробиотиков для очистки в лечебно-профилактических организациях, является риск заражения пациентов спорами *Bacillus* spp. и отсутствие систематических исследований безопасности пробиотиков [10]. В других зарубежных исследованиях 2013–2017 гг. в течение 4 лет оценивали эффективность чистящих пробиотических средств (содержащих 3–5 видов *Bacillus* spp.) по сравнению со стандартными химическими препаратами для очистки и дезинфекции поверхностей. В этих работах авторы показали безопасность и качество метода биологического регулирования численности внутрибольничных микроорганизмов, который может быть использован как альтернатива химическим дезинфицирующим средствам. Результаты, собранные за более чем 4 года, показали, что чистящие средства на основе пробиотиков достоверно предупреждали рост патогенных микроорганизмов на обрабатываемых поверхностях более чем на 90% по сравнению с обычными моющими и дезинфицирующими средствами. Кроме того, показано, что *Bacillus* spp. оказались генетически очень стабильны, поскольку они не приобретали нового гена устойчивости в течение 4 лет непрерывного использования, несмотря на их непрерывный контакт

с больничными поверхностями и разными видами лекарственно-устойчивых микроорганизмов [7]. В период непрерывной обработки поверхностей и предметов пробиотическими средствами авторы проводили анализ высокочувствительными молекулярными методами более 32 000 образцов биоматериала пациентов с ИСМП, в результате которого не найдены положительные пробы с высевом спор и вегетативных форм *Bacillus* spp., что свидетельствует об отсутствии риска заражения пациентов. Следует отметить, что из-за ферментативной деятельности *Bacillus* spp. (наличия у них эстераз, липаз, гликозидаз, фосфатаз) усилена их моющая активность, что позволило снизить количество используемых чистящих препаратов. Кроме того, обычные дезинфектанты обладают неспецифическим биоцидным действием, а также связываются с органическими загрязнениями, что влечет за собой вторичную контаминацию поверхностей и селекцию устойчивых к антимикробным препаратам патогенных штаммов микроорганизмов. Проведенные зарубежные исследования подтвердили отсутствие таких свойств у чистящих препаратов на основе пробиотиков [5, 6, 16, 17].

С целью получения опыта использования чистящих пробиотических средств на территории Российской Федерации нами проведены исследования по оценке их эффективности в условиях поликлиники.

Материалы и методы

Проводили оценку эффективности действия чистящих средств на основе пробиотиков для очистки помещений, а именно средства для напольных покрытий для сравнительной оценки с эффектом уборки и дезинфекции помещений традиционным способом. Исследования проводили в двух помещениях медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера: процедурном кабинете (опыт) и в кабинете врача-гинеколога (контроль). Эти помещения имеют похожую микробную нагрузку и интенсивность посещаемости пациентами. Полы кабинетов подвергали уборке и дезинфекции ежедневно после окончания приема пациентов в 18:30. Пол в процедурном кабинете обрабатывали тестируемым средством для напольных покрытий, используя отдельный моп из хлопка, инвентарь для уборки. Пол в кабинете врача-гинеколога обрабатывали традиционным способом с применением моюще-дезинфицирующих средств, используя отдельный инвентарь для уборки. За уборку каждого из кабинетов отвечал отдельный представитель среднего медицинского персонала. Забор материала для микробиоло-

гического посева проводили в обоих кабинетах ежедневно 2 раза в день в течение 30 дней: в 8:45 утра — до начала приема пациентов; в 18:15 вечера — после окончания приема пациентов и до начала уборки полов. Отбор проб для исследования производили согласно МУК 4.2.2942-11. Пробы брали из центральной части пола в каждом кабинете с помощью ватно-марлевого тампона с площади 100 см². Тампон помещали в пробирку с 2 мл стерильной 0,1% пептонной воды и доставляли в лабораторию. Посев проб производили на 3 чашки Петри с «кровяным» агаром (КА) на основе среды «агар Гивенталя–Ведьминой» (АГВ) истощающим штрихом (метод Гольда) для определения числа бактерий и получения изолированных колоний микроорганизмов. Инкубировали в термостате 24 ч при температуре +37°C, после чего определяли количество выросших колоний на каждой чашке со средой, вычисляли среднее арифметическое для трех чашек, делали отметку в рабочем журнале. Из всех выросших на чашках бактерий получали «чистые культуры» путем высева на КА и инкубирования еще 24 ч при температуре +37°C. Каждую выделенную культуру бактерий идентифицировали с помощью микроскопии, биохимического типирования и масс-спектрометрического анализа на анализаторе MALDI-TOF (Bruker).

Результаты и обсуждение

В контроле и в опыте до начала эксперимента (0) высевали *E. faecium* 10⁴–10⁵ КОЕ. На рисунке 1 показана динамика высеваемости микроорганизмов в контроле, где проводили

уборку и дезинфекцию стандартным способом. До 2 дня наблюдения преобладал *E. faecium*, затем его рост прекратился. На 2–4 день наблюдали рост бактерий семейства *Enterobacteriaceae* до 10⁶ КОЕ, далее показатели их роста находились на уровне 10 КОЕ до конца срока наблюдения. С 5 дня эксперимента в контроле выявляли рост бактерий рода *Staphylococcus* spp., в основном представители *S. epidermidis*. На рисунке 2 представлена динамика роста микроорганизмов в опыте, где уборку проводили с тестируемым средством. С 1 дня наблюдения выявляли достоверный рост бактерий *Bacillus* spp. на уровне 10⁵ КОЕ, затем до конца срока эксперимента их рост составил 10²–10³ КОЕ. В 1–2 день выявляли рост *E. faecium*, далее он прекратился. На 2–4 день наблюдали рост бактерий семейства *Enterobacteriaceae* до уровня 10⁶ КОЕ и на 8 день — до 10² КОЕ, в остальные дни рост отсутствовал. Рост бактерий рода *Staphylococcus* spp. отмечен на 8 и 15 день наблюдения до уровня 10–10² КОЕ, основной представитель — *S. epidermidis*.

Использование пробиотического средства для очистки помещений, а именно средства для напольных покрытий, способствует накоплению спорных бацилл сначала до уровня 10⁵ КОЕ, затем этот показатель стабилизируется до уровня 10²–10³ КОЕ. На этом фоне в опыте наблюдали достоверное снижение уровня микробной контаминации санитарно-показательными микроорганизмами: отсутствие роста *E. faecium* с 3 дня эксперимента; отсутствие роста представителей семейства *Enterobacteriaceae* с 4 дня обработки средством; практически полное отсутствие роста бактерий рода *Staphylococcus* spp.

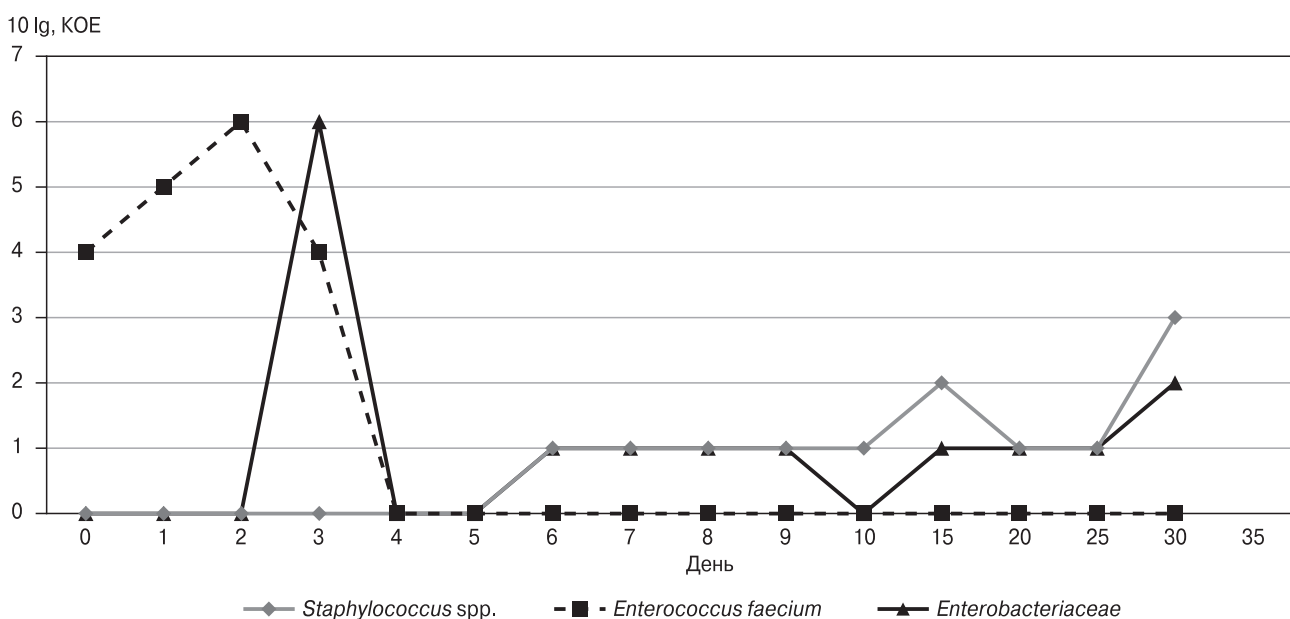


Рисунок 1. Показатели динамики роста микроорганизмов в контроле

Figure 1. Dynamics of bacteria growth in control

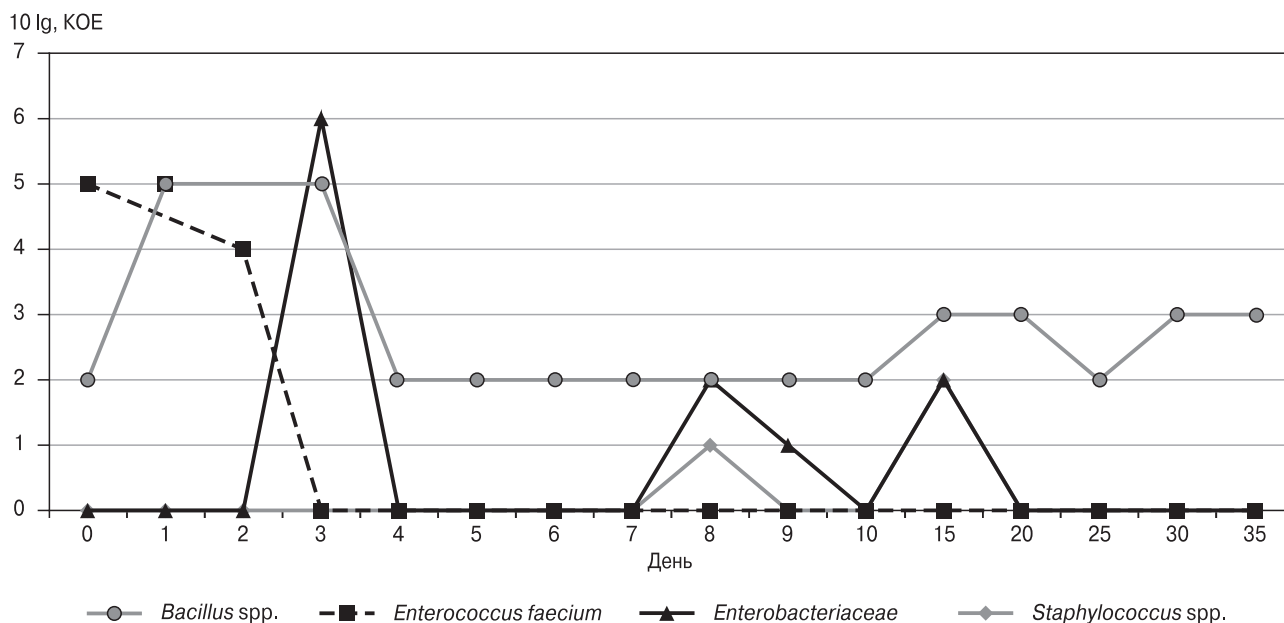


Рисунок 2. Показатели динамики роста санитарно-показательных микроорганизмов и *Bacillus* spp. в опыте

Figure 2. Dynamics of sanitary-indicative microorganisms' and *Bacillus* spp. growth in experiment

При этом в контроле наблюдали рост санитарно-показательных микроорганизмов — *E. faecium*, семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Staphylococcus* spp. на протяжении всего срока наблюдения. На основании вышеизложенного можно заключить, что использование пробиотических средств для очистки помещений сдерживает рост санитарно-показательных микроорганизмов по сравнению с контролем. Средство обладает приятным запахом и достаточным пенообразованием, удобно в применении, не вызывает аллергических реакций у персонала. Деконтаминация обрабатываемых поверхнос-

тей и стабильное присутствие на них бактерий рода *Bacillus* spp. достигаются уже через 4–7 дней от начала эксперимента.

Таким образом, пробиотические чистящие средства могут быть использованы преимущественно с целью профилактической очистки, а не для быстрой дезинфекции как химические препараты. Полученные нами данные подтверждают результаты зарубежных исследований и позволяют положительно оценить перспективность работ по созданию и дальнейшему изучению альтернативных пробиотических чистящих средств.

Список литературы/References

1. Коза Н.М. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Эпидемиология и профилактика (обзорная лекция) // Пермский медицинский журнал. 2013. Т. 30, № 3. С. 135–143. [Kozha N.M. Infections connected with rendering medical care. epidemiology and prevention (review lecture). *Permskii meditsinskii zhurnal = Perm Medical Journal*, 2013, vol. 30, no. 3, pp. 135–143. (In Russ.)]
2. Эпидемиологическое наблюдение за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи: федеральные клинические рекомендации. Москва, 2014, 58 с. [Epidemiologicheskoe nablyudenie za infektsiyami, svyazannymi s okazaniem meditsinskoi pomoshchi: federal'nye klinicheskie rekomendatsii [Epidemiological surveillance of infections associated with the provision of medical care: federal clinical guidelines]. Moscow, 2014, 58 p. URL: http://nasci.ru/_resources/directory/198/common/2014_7_Epid_nabl_new.pdf (19.12.2017)]
3. Aiello A., Larson E. Antibacterial clearing and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, vol. 3, iss. 8, pp. 501–506. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00723-0
4. Burke J.P. Infection control – a problem for patient safety. *N. Engl. J. Med.*, 2003, no. 348, pp. 651–656. doi: 10.1056/NEJMhpr020557
5. Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. *Microb. Biotechnol.*, 2017, vol. 10, no. 5, pp. 1079–1083. doi: 10.1111/1751-7915.12755
6. Caselli E., Antonioli P., Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation. *J. Hosp. Inf.*, 2016, no. 94, iss. 2, pp. 193–194. doi: 10.1016/j.jhin.2016.06.021
7. Caselli E., D'Accolti M., Vandini A., Lanzoni L., Camerada M.T., Coccagna M., Branchini A., Antonioli P., Balboni P.G., Di Luca D., Mazzacane S. Impact of a probiotic-based cleaning intervention on the microbiota ecosystem of the hospital surfaces: focus on the resistome remodulation. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 2:e0148857. doi:10.1371/journal.pone.0148857
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities. 2008. URL: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines.pdf> (19.12.2017)

9. Dancer S.J. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J. Hosp. Infect.*, 2009, vol. 73, no. 4, pp. 378–385. doi: 10.1016/j.jhin.2009.03.030
10. Doron S., Snyderman D.R. Risk and safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, vol. 60, suppl. 2, pp. S129–S134. doi: 10.1093/cid/civ085
11. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals – protocol version 5.3. s. Stockholm: ECDC, 2013. URL: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf> (19.12.2017)
12. Falagas M.E., Makris G.C. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J. Hosp. Infect.*, 2009, vol. 71, no. 4, pp. 301–306. doi: 10.1016/j.jhin.2008.12.008
13. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, no. 1, pp. 15–25. doi: 10.1038/nrmicro2259
14. Kramer A., Schwebke I., Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.*, 2006, no. 6, p. 130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130
15. Otter J.A., Yezli S., Salkeld J.A., French G.L. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am. J. Infect. Control*, 2013, no. 41, pp. S6–S11. doi: 10.1016/j.ajic.2012.12.004
16. Vandini A., Frabetti A., Antonioli P., Platano D., Branchini A., Camerada M.T., Lanzoni L., Balboni P., Mazzacane S. Reduction of the microbiological load on hospital surfaces through probiotic-based cleaning procedures: a new strategy to control nosocomial infections. *J. Microbiol. Exp.*, 2014, vol. 1, no. 5:00027. doi: 10.15406/jmen.2014.01.00027
17. Vandini A., Temmerman R., Frabetti A., Caselli E., Antonioli P., Balboni P.G., Platano D., Branchini A., Mazzacane S. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 9: e108598. doi: 10.1371/journal.pone.0108598

Авторы:

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

Краева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией клинической бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

Веретенников В.В., студент Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины, стажер лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

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

Kraeva L.A., PhD, MD (Medicine), Head of Clinical Bacteriological Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Veretennikov V.V., St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine Student; Trainee of Clinical Bacteriological Laboratory, St. Petersburg State University, 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

Абашина В.Л.	409	Любимова А.В.	350	Boiro M.Y.	375
Аверьянова М.Ю.	350	Мартынова А.В.	409	Burkitbayev Z.K.	383
Асланов Б.И.	350	Мокроусов И.В.	367	Egorova S.A.	375
Афиногенов Г.Е.	419	Нарвская О.В.	367	Kaftyreva L.A.	375
Афиногенова А.Г.	419	Нечаев В.В.	350	Konstantinov O.K.	375
Ахмедова Г.М.	367	Новикова Е.Г.	359	Lavrentyeva I.N.	319
Борисов А.Г.	327	Ряховских С.А.	350	Makarova M.A.	375
Брико Н.И.	359	Савченко А.А.	327	Matveeva Z.N.	375
Бродина Т.В.	350	Садртдинова Г.Р.	413	Ostankova Yu.V.	383
Веретенников В.В.	419	Семейкина Л.М.	409	Popova A.Yu.	375
Вязовая А.А.	367	Симбирцев А.С.	341	Porin A.A.	375
Герасимова А.А.	367	Скворцова А.И.	359	Savchuk T.N.	383
Горькая А.Ю.	409	Соловьева Н.С.	367	Semenov A.V.	383
Гребенкина Н.С.	405	Старкова Д.А.	367	Slita A.V.	319
Жукова О.В.	359	Трушина О.И.	359	Smirnov V.S.	319
Журавлев В.Ю.	367	Туркин Е.Н.	367	Suzhaeva L.V.	375
Исаева Д.Р.	359	Халдин А.А.	359	Totolian Areg A.	375, 383
Каприн А.Д.	359	Харченко Е.П.	393	Voitenkova E.V.	375
Контаров Н.А.	405	Шабалдин А.В.	341	Zabrovskaya A.V.	375
Краева Л.А.	419	Шабалдина Е.В.	341	Zarubaev V.V.	319
Кудрявцев И.В.	327	Шалыпина Н.А.	350	Zueva E.V.	375
Лопухов П.Д.	359	Юминова Н.В.	405		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активные формы кислорода.....	327	очистка поверхностей.....	419
аногенитальные бородавки.....	359	постинъекционные осложнения.....	409
аутокомплемментарные последовательности.....	393	превалентность.....	350
бактериальные филумы.....	341	пробиотики.....	419
бактерии.....	413	пробиотическая очистка.....	419
бактериофаги.....	413	рак шейки матки.....	359
ванкомицин-резистентные энтерококки.....	350	рекомбинация вирусов.....	393
вирус папилломы человека.....	359	респираторный взрыв.....	327
внутрибольничные инфекции.....	409	смертность.....	359
выделение.....	413	сплиготицирование.....	367
геном вирусов.....	393	степень гидратации.....	405
генотип Weijing.....	367	супероксид-радикал.....	327
гипертрофия миндалин лимфоидного		трансплантация костного мозга.....	350
глоточного кольца.....	341	туберкулез легких.....	367
гнойно-септические инфекции.....	409	устойчивость патогенов к дезинфектантам.....	419
гомологичные последовательности.....	393	фагоцитирующие клетки.....	327
госпитальные инфекции.....	409	факторы риска.....	350
дисбиоз верхних дыхательных путей.....	341	химические дезинфектанты.....	419
заболеваемость.....	359	эпидемиология внутрибольничных инфекций.....	409
иммуногенность вируса гриппа.....	405	anti-inflammatory activity.....	319
интерференция вирусов.....	393	antioxidant activity.....	319
инфекции мочевыводящего тракта.....	409	antivirals.....	319
инфекции, передаваемые половым путем.....	359	ascorbic acid.....	319
инфекции, связанные с оказанием		<i>Comamonas kerstersii</i>	375
медицинской помощи.....	350	DNA HBV.....	383
инфекционно-воспалительные заболевания.....	327	<i>Enterobacteriaceae</i>	375
Калининградская область.....	367	<i>Enterococcus</i> spp.....	375
комплемментарные последовательности.....	393	<i>Escherichia coli</i>	375
лекарственная устойчивость.....	367	<i>Hafnia alvei</i>	375
литическая активность.....	413	hepatitis B.....	383
метод.....	413	influenza.....	319
модель адсорбции Брунауэра—Эммета—Теллера.....	405	intestine microbiome.....	375
молекулярная эпидемиология.....	367	molecular epidemiology.....	383
молекулярно-генетическое типирование.....	350	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	367
моноциты.....	327	occult HBV.....	383
морфология.....	413	Republic of Guinea.....	375
нейраминидаза.....	405	<i>Staphylococcus aureus</i>	375
нейтрофилы.....	327	vitamin C.....	319

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ Г.Р. САДРТДИНОВОЙ «УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ К. ОХУТОСА» (с. 413–418)

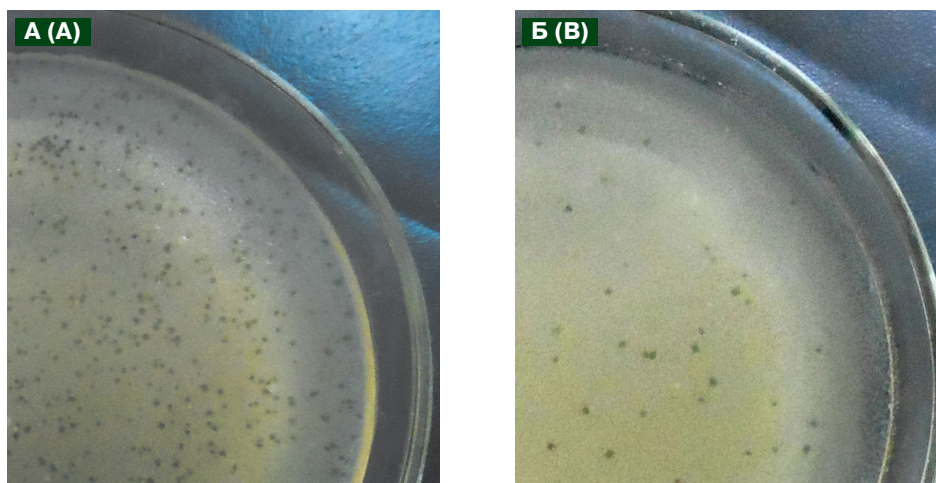


Рисунок 1. Морфология негативных колоний бактериофага КО-8724 УГСХА на: А) МПА; Б) АФ (18 ч, 37°C)

Figure 1. Morphology of negative colonies of bacteriophage KO-8724 USGHA on: A) MPA; B) AF (18 hours, 37°C)

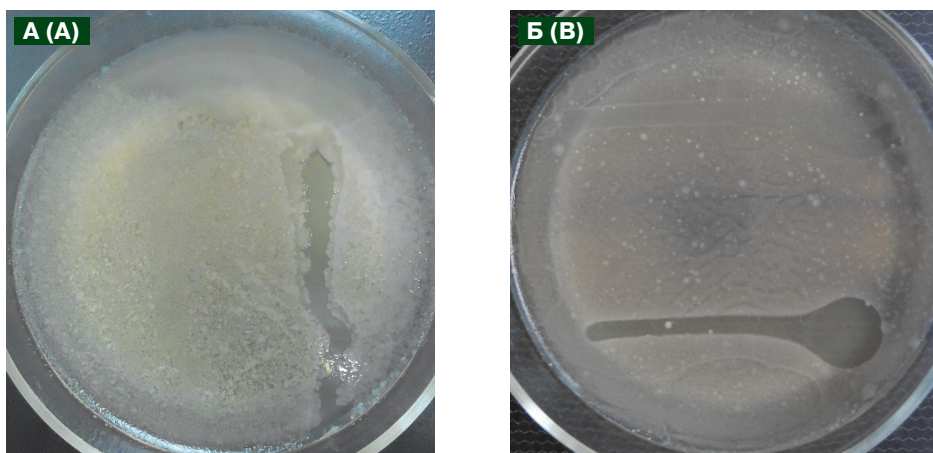


Рисунок 2. Определение специфичности бактериофага КО-3 УГСХА в отношении индикаторных штаммов бактерий рода *Klebsiella* на: А) МПА; Б) АФ (18 ч, 37°C)

Figure 2. Determination of the specificity of the bacteriophage KO-3 USGHA for indicator strains of bacteria of the genus *Klebsiella* on: A) MPA; B) AF (18 hours, 37°C)

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

