

2019

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Вирус гепатита В и сайт-специфические нуклеазы: влияние генетических модификаций CRISPR/Cas9 на противовирусную активность» (авторы: А.П. Костюшева, С.А. Брезгин, Д.Н. Зарифьян, Д.С. Чистяков, В.И. Гегечкори, Е.О. Баюрова, Е.В. Волчкова, Д.С. Костюшев, В.П. Чуланов) (с. 279–287)

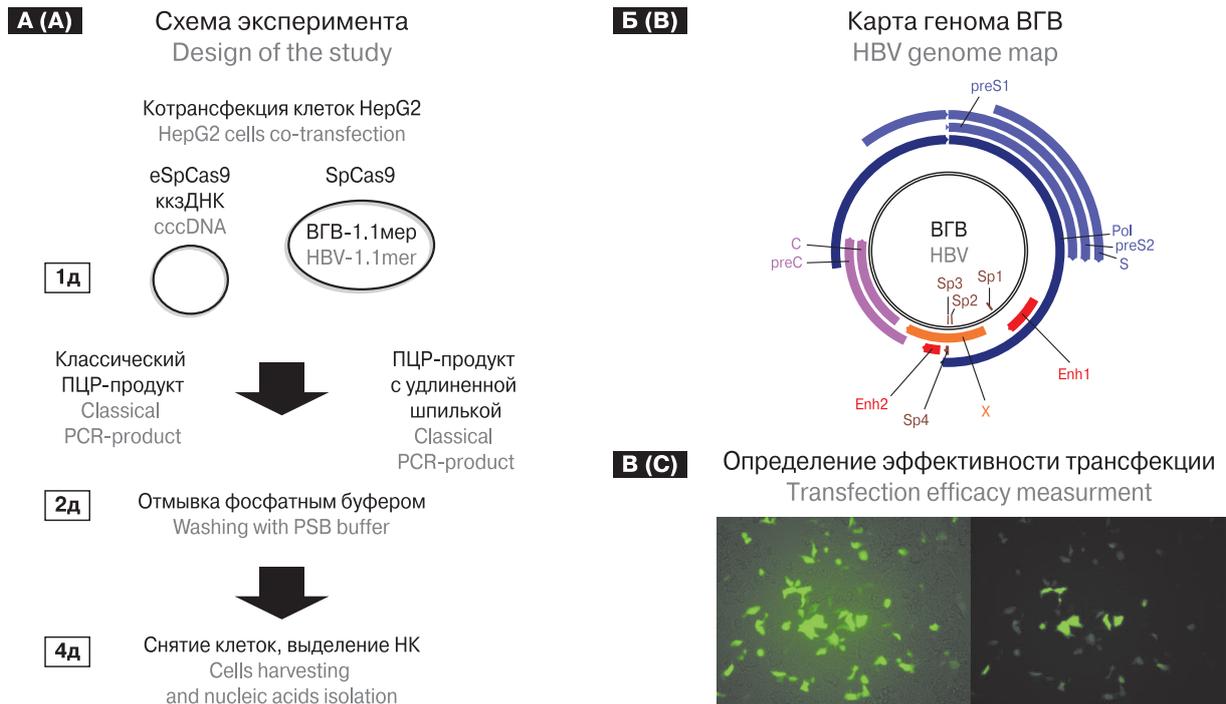


Рисунок 1. Схема и условия эксперимента

Figure 1. Study design and experimental conditions

А) Карта генома в ВГВ генотипа D с отмеченными участками-мишенями для РНК-проводников (Sg1-Sg4). Б) Схема котрансфекции клеток HepG2 рекомбинантной ккзДНК (описание в тексте). В) Флуоресцентные микрофотографии трансфицированных клеток в светлом поле и канале FITC (слева) и на канале FITC (справа), 10-кратное увеличение. Эффективность трансфекции составила 25%.

A) HBV genotype D genome map denote aligned gRNAs target sequences (Sg1-Sg4). B) Scheme of HepG2 co-transfection with recombinant cccDNA (details are shown in main text). C) Fluorescent microimaging of transfected cells in the bright field (left) and on FITC channel (right), x10 magnification. Transfection efficacy was 25%.

Иллюстрации к статье «Выбор оптимального метода выделения бактериофагов бактерий рода *Flavobacterium*» (авторы: А.Г. Семанин, Г.Р. Садртдинова) (с. 399–403)

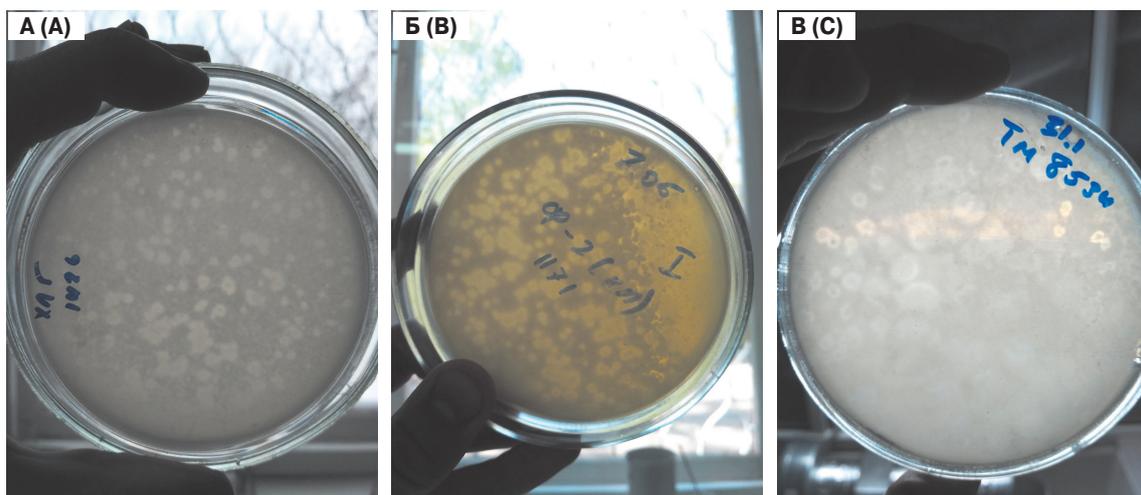


Рисунок. Выделение бактериофагов из внешней среды: А) *F. johnsoniae* VKM B-1426; Б) *F. pectinovorum* VKM B-1171; В) *F. aquatile* VKPM B-8534

Figure. Isolation of bacteriophages from environmental source: A) *F. johnsoniae* VKM B-1426; B) *F. pectinovorum* VKM B-1171; C) *F. aquatile* VKPM B-8534

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

апрель–июнь

2019, том 9

№ 2

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
Брей П. д.б.н., профессор, директор Института Пастера в Лаосе, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней, Вьентьян, Лаос
Гинцбург А.Л. д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Дозо Ч. д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада
Лаврентьева И.Н. д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Лобзин Ю.В. д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Лоузир Э. профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис
Львов Д.К. д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Мануссакис М. директор Института Пастера Греции, Афины, Греция
Медуницын Н.В. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
Михайлов М.И. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
Найденски Х. д.м.н., профессор, директор Института микробиологии им. Стефана Ангелюффа, зав. отделом инфекционной микробиологии, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, первый заместитель председателя Комитета Государственной Думы по образованию и науке, Москва, Россия
Покровский В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
Сантони А. зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
Симбирцев А.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель 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, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
Шпигель А. д.м.н., профессор, директор Института Пастера Мадагаскара, Антананариву, Мадагаскар

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, советник директора 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: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

Редактор перевода: Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

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

Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (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.
Тел.: (812) 233-08-58.

Издательство НИИЭМ имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 232-07-42.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»

196084, Санкт-Петербург,
ул. Коли Томчака, 28.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 24.06.2019 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1195

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2019
© НИИЭМ имени Пастера, 2019
© СПб РО РААКИ, 2019

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

April–June

2019, volume 9

No. 2

The journal is published with the assistance of the Branch of All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists for St. Petersburg and Leningrad Region

Editor-in-chief

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, N.F. Gamaleya Federal Center 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, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

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

Andre Spiegel PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Madagascar, Director, Antananarivo, Madagascar

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, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
- Boris I. Vishnevsky** PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthiopulmonology, 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, Adviser of the Director, 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
- 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: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)

Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)

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

Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (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.
Tel.: (812) 233-08-58.

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 Allegro Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,
Koli Tomchaka str., 28.
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 24.06.2019. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2019

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2019

© SPb RAACI, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В.

ВРОЖДЕННЫЕ ДИСФУНКЦИИ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНВАЗИВНОЙ И РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ 229

Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Останин А.А.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С 239

Поздеев О.К., Поздеева А.О., Валеева Ю.В., Гуляев П.Е., Савинова А.Н.

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *HELICOBACTER PYLORI* С ЭПИТЕЛИЕМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА. II. РЕАКЦИЯ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА В ОТВЕТ НА КОЛОНИЗАЦИЮ И ПЕРСИСТИРОВАНИЕ *H. PYLORI* 253

Оригинальные статьи

Горбатов А.А., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Бахтеева И.В., Аронова Н.В., Павлович Н.В., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В.

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИИ ЖИВОТНЫХ С РАЗНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ 262

Смирнов В.С., Савельев С.А., Петленко С.В., Редлих Г., Ерофеева М.К., Левина А.В., Завьялова Н.И.

ОТКРЫТОЕ СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ «ЦИТОВИР-3» И «АРБИДОЛ» ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ ДЕТЕЙ В ПЕРИОД СЕЗОННОГО ПОДЪЕМА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ 273

Костюшева А.П., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Чистяков Д.С., Гегечкори В.И., Бажурова Е.О., Волчкова Е.В., Костюшев Д.С., Чуланов В.П.

ВИРУС ГЕПАТИТА В И САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ НУКЛЕАЗЫ: ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ CRISPR/Cas9 НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ 279

Кравченко Л.В.

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В СЛУЧАЯХ ПОЗДНЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА 288

Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Заиченко И.Е., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Бабайкина О.Н.

ЭКСПРЕССИЯ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА Т-ХЕЛПЕРАХ КРОВИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С *HELICOBACTER PYLORI*: ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРОДУОДЕНИТЕ И ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ 295

Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Старшинова А.А., Зинченко Ю.С., Басанцова Н.Ю., Беляева Е.Н., Павлова М.В., Яблонский П.К.

НАРУШЕНИЯ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ Т-ХЕЛПЕРОВ 17 И ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ 304

Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И., Гончарова А.Ю., Ключева С.Н., Щербаклова С.А.

АССОЦИАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАРКЕРОВ Th1 и Th2 ИММУНИТЕТА С ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ HLA У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ 315

Снегова Н.Ф., Костинов М.П., Пахомов Д.В., Ильина Н.И.

ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ КОРИ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫМИ МАТЕРЯМИ (КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ) 325

Драгомерецкая А.Г., Игнатьева М.Е., Троценко О.Е., Мжельская Т.В., Будацыренова Л.В., Григорьева В.И., Романова А.П.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЕСТЕСТВЕННОГО ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ) 337

Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И., Вавилов Н.В.

ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ И БЕЛКОВ ЭЯКУЛЯТА ПРИ РАЗНОЙ ЭХОСКОПИЧЕСКОЙ КАРТИНЕ ПРДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	347
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Зекореева А.Х.

ПРОБЛЕМА КОКЛЮША В НЕКОТОРЫХ РЕГИОНАХ МИРА	354
---------------------------------------------------------	------------

Краткие сообщения

Николенко М.В., Барышникова Н.В., Бахлыкова Е.А., Зыкова А.В., Романченко К.В.

БИОРЕГУЛЯЦИЯ АМПЛИТУДНО-ФАЗОВОЙ СТАБИЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ CANDIDA ALBICANS МИКРОСИМБИОНТАМИ ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА	363
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Сомова Л.М., Шубин Ф.Н., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Плехова Н.Г.

ВОСПАЛЕНИЕ, ИНДУЦИРОВАННОЕ РАЗНЫМИ ПЛАЗМИДНЫМИ ТИПАМИ РОССИЙСКИХ ШТАММОВ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS	369
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Кожухова Е.А., Горбова И.В.

ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУЧАЕВ ОСТРОЙ ДИАРЕИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ С ПОЗИТИВНОЙ РЕАКЦИЕЙ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА НОРОВИРУС	375
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Контаров Н.А., Юминова Н.В., Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нурматов З.Ш., Погарская И.В.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА Е, В ПОПУЛЯЦИИ	381
-------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Методы

Гурьев А.С., Шалатова О.Ю., Русанова Е.В., Василенко И.А., Волков А.Ю.

КОГЕРЕНТНАЯ ФЛУКТУАЦИОННАЯ НЕФЕЛОМЕТРИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ	385
----------------------------------------------------------------------------------	------------

Уткин Д.В., Киреев М.Н., Гусева Н.П., Каплун Г.А., Куклев В.Е., Осина Н.А.

РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ	393
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Семанин А.Г., Садртдинова Г.Р.

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА FLAVOBACTERIUM	399
---------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Ветчинин С.С., Щит И.Ю., Шевяков А.Г., Бикетов С.Ф.

ВОЗМОЖНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА ПРИ СОЧЕТАНИИ МЕТОДОВ ИММУНОБЛОТТИНГА И АМПЛИФИКАЦИИ ДНК	404
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Домотенко Л.В., Косилова И.С., Шепелин А.П.

ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ АГАР МЮЛЛЕРА–ХИНТОН: СООТВЕТСТВИЕ СОВРЕМЕННЫМ ТРЕБОВАНИЯМ	409
--------------------------------------------------------------------------------------	------------

Правила для авторов	417
----------------------------------	------------

Авторский указатель	420
----------------------------------	------------

Предметный указатель	420
-----------------------------------	------------

CONTENTS

Reviews

Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V.

CONGENITALLY IMPAIRED PATTERN-RECOGNITION RECEPTORS IN PATHOGENESIS OF PEDIATRIC INVASIVE AND RECURRENT PNEUMOCOCCAL INFECTION 229

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Starostina N.M., Ostanin A.A.

DENDRITIC CELLS IN THE PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS C 239

Pozdeev O.K., Pozdeeva A.O., Valeeva Yu.V., Gulyaev P.E., Savinova A.N.

MECHANISMS OF INTERACTING *HELICOBACTER PYLORI* WITH GASTRIC MUCOSAL EPITHELIUM. II. A REACTION OF GASTRIC EPITHELIUM ON *HELICOBACTER PYLORI* COLONIZATION AND PERSISTENCE 253

Original articles

Gorbatov A.A., Titareva G.M., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Bakhteeva I.V., Aronova N.V., Pavlovich N.V., Mokrievich A.N., Firstova V.V.

FEATURES OF HUMORAL ANSWER IN EXPERIMENTAL ANIMAL TULAREMIA WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO INFECTION 262

Smirnov V.S., Savelyev S.A., Petlenko S.V., Redlich G., Erofeeva M.K., Lyovina A.V., Zaviyalova N.I.

COMPARATIVE EFFICACY AND SAFETY OF PREVENTIVE TREATMENT WITH CYTOVIR-3 AND ARBIDOL IN CHILDREN DURING SEASONAL OUTBREAK OF RESPIRATORY VIRAL INFECTION (AN OPEN-LABEL RANDOMIZED CLINICAL STUDY) 273

Kostyusheva A.P., Brezgin S.A., Zarifyan D.N., Chistyakov D.S., Gegechkory V.I., Bayurova E.O., Volchkova E.V., Kostyushev D.S., Chulanov V.P.

HEPATITIS B VIRUS AND SITE-SPECIFIC NUCLEASES: EFFECTS OF GENETIC MODIFICATIONS IN CRISPR/Cas9 ON ANTIVIRAL ACTIVITY 279

Kravchenko L.V.

A ROLE OF IMPAIRED NEONATAL T CELL ACTIVATION UPON LATE CMV DETECTION 288

Talayev V.Yu., Talaeyva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.Ye., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Babaykina O.N.

CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION ON PERIPHERAL BLOOD T-HELPER CELLS IN *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED DISEASES: CHRONIC GASTRODUODENITIS AND PEPTIC ULCER DISEASE 295

Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Starshinova A.A., Zinchenko Yu.S., Basantsova N.Yu., Belyaeva E.N., Pavlova M.V., Yablonskiy P.K.

ALTERED PERIPHERAL BLOOD Th17 AND FOLLICULAR T-HELPER SUBSETS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS 304

Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Goncharova A.Yu., Klyueva S.N., Shcherbakova S.A.

AN ASSOCIATION BETWEEN PARAMETERS OF Th1 AND Th2 CELL-RELATED FUNCTIONAL ACTIVITY AND HLA GENE POLYMORPHISM IN INDIVIDUALS AFTER ANTI-PLAGUE VACCINATION 315

Snegova N.F., Kostinov M.P., Pakhomov D.V., Ilina N.I.

MEASLES VACCINATION OF CHILDREN BORN TO HIV-INFECTED MOTHERS (CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS) 325

Dragomeretskaya A.G., Ignatyeva M.E., Trotsenko O.E., Mzhelskaya T.V., Budatsirenova L.V., Grigoryeva V.I., Romanova A.P.

ASSESSING NATURAL HERD IMMUNITY TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS IN REPUBLIC SAKHA (YAKUTIA) 337

Godovalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I., Vavilov N.V.

INVESTIGATION OF EJACULATE MICROFLORA AND PROTEIN COMPOSITION IN VARIOUS PROSTATE ULTRASOUND PATTERNS 347

Basov A.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Zekoreeva A.Kh.

THE PROBLEM OF PERTUSSIS IN SOME GEOGRAPHIC REGIONS OF THE WORLD 354

Short communications

<i>Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Bakhlykova E.A., Zykova A.V., Romanchenko K.V.</i> BIOREGULATION OF AMPLITUDE-PHASE BIOLOGICAL ACTIVITY OF <i>CANDIDA ALBICANS</i> BY WOMEN REPRODUCTIVE TRACT MICROSymbionTS	363
<i>Somova L.M., Shubin F.N., Drobot E.I., Lyapun I.N., Plekhova N.G.</i> INFLAMMATION INDUCED BY DIFFERENT PLASMID TYPES OF RUSSIAN <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> STRAINS	369
<i>Kozhukhova E.A., Gorbova I.V.</i> CHARACTERISTICS OF ACUTE DIARRHEA IN ADULT PATIENTS POSITIVE FOR NORWALK VIRUS	375
<i>Kontarov N.A., Yuminova N.V., Alatortseva G.V., Likhverchik L.N., Nurmatov Z.Sh., Pogarskaya I.V.</i> A MATHEMATICAL MODEL FOR DEVELOPING HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN HUMAN POPULATION	381
Methods	
<i>Gur'ev A.S., Shalatova O.Yu., Rusanova E.V., Vasilenko I.A., Volkov A.Yu.</i> COHERENT FLUCTUATION NEPHELOMETRY IN CLINICAL MICROBIOLOGY	385
<i>Utkin D.V., Kireev M.N., Guseva N.P., Kaplun G.A., Kuklev V.E., Osina N.A.</i> A MICROCHIP DEVELOPED FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST PLAQUE-DERIVED ANTIGENS	393
<i>Semanin A.G., Sadrtidina G.R.</i> CHOOSING A PROPER APPROACH FOR ISOLATING BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO <i>FLAVOBACTERIUM</i> GENUS BACTERIA	399
<i>Vetchinin S.S., Shchit I.Yu., Shevyakov A.G., Biketov S.F.</i> THE POSSIBILITY OF IDENTIFYING INDIVIDUAL STRAINS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS PATHOGENS WITH A COMBINATION OF IMMUNOBLOTTING AND DNA AMPLIFICATION METHODS	404
<i>Domotenko L.V., Kosilova I.S., Shepelin A.P.</i> RUSSIA-MADE MUELLER–HINTON AGAR: COMPLIANCE WITH CONTEMPORARY REQUIREMENTS	409
Instructions to Authors	417
Author index	420
Subject index	420

ВРОЖДЕННЫЕ ДИСФУНКЦИИ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНВАЗИВНОЙ И РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

С.Ю. Терещенко, М.В. Смольникова

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

Резюме. В обзоре освещены имеющиеся к настоящему времени данные, показывающие наличие врожденных особенностей иммунного реагирования, предрасполагающих к рецидивирующему и инвазивному течению пневмококковых инфекций у детей. Капсульные формы грампозитивной бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококка) являются в настоящее время ведущей бактериальной причиной заболеваемости и смертности детей раннего возраста, особенно в развивающихся странах и в популяциях с низким социально-экономическим статусом. При отсутствии противопневмококковой вакцинации у значительной части носителей развиваются неинвазивные (пневмония, средний отит, синусит) и тяжелые инвазивные (бактериемия/септицемия, менингит) пневмококковые заболевания. Успешное проникновение пневмококка через слизистые оболочки зависит от большого количества факторов, как со стороны самой бактерии (факторов вирулентности), так и со стороны комплекса защитных компонентов иммунной системы организма-хозяина. Система TLR сигналинга играет важнейшую роль в неспецифической защитной реакции организма человека при его первой встрече с патогеном. TLR различных типов относятся к первому из описанных семейств паттерн-распознающих мембранных молекул, для которых лигандами являются специфические участки внешней оболочки бактерий. Система комплемента является древнейшим компонентом врожденного иммунитета, основной функцией которого является преимущественно интраваскулярная элиминация бактериальных агентов. Кроме того, протеины комплемента играют роль своеобразного моста между системами врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивая адекватные условия для созревания и дифференциации В- и Т-лимфоцитов. Поскольку пневмококк секретирует IgA-протеазу, защитная роль локально продуцируемых антител класса IgA при реализации активного инфекционного процесса в этом случае невелика. Именно поэтому дефекты адаптивного В-клеточного звена иммунитета и системы комплемента занимают ведущую позицию среди наследственно обусловленных причин тяжелого и рецидивирующего течения пневмококковых инфекций у детей. Мы пришли к выводу, что наиболее важными врожденными иммунными дефектами для инвазивных и рецидивирующих пневмококковых инфекций являются дисфункции В-лимфоцитов, дефицит компонентов комплемента и дисфункции рецептор-распознающих рецепторов (Toll-подобных рецепторов: TLR-2, -9, -4; протеина-адаптера MYD88; ферментов TLR-каскада: IRAK4, NEMO; NOD-подобных рецепторов: NOD2, NLRP3; лектинов С-типа: MBL, Dectin-2, а также, возможно, фиколина). Указанные данные целесообразно использовать при планировании иммунологического тестирования детей с инвазивными и рецидивирующими пневмококковыми инфекциями и организации иммуногенетических исследований в этой области.

Ключевые слова: паттерн-распознающие рецепторы, Toll-подобные рецепторы, пневмококковая инфекция, врожденный иммунитет, дети.

Адрес для переписки:

Терещенко Сергей Юрьевич
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
НИИ медицинских проблем Севера.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-83.
E-mail: legise@mail.ru

Contacts:

Sergey Yu. Tereshchenko
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3g,
Scientific Research Institute of Medical Problems of the North.
Phone/Fax: +7 (391) 228-06-83.
E-mail: legise@mail.ru

Библиографическое описание:

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В. Врожденные дисфункции паттерн-распознающих рецепторов в патогенезе инвазивной и рецидивирующей пневмококковой инфекции у детей // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 229–238. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-229-238

Citation:

Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V. Congenitally impaired pattern-recognition receptors in pathogenesis of pediatric invasive and recurrent pneumococcal infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 229–238. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-229-238

CONGENITALLY IMPAIRED PATTERN-RECOGNITION RECEPTORS IN PATHOGENESIS OF PEDIATRIC INVASIVE AND RECURRENT PNEUMOCOCCAL INFECTION

Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V.

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

Abstract. Here we review currently available data showing that innate immune signs predisposing to recurrent and invasive pneumococcal infections were identified in children. *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) belongs to Gram-positive bacteria being the major cause of morbidity and mortality in infants, especially in developing countries and in communities with low socioeconomic status. Due to the lack of anti-pneumococcal vaccination, the significant proportion of pneumococcus carriers develop non-invasive (pneumonia, otitis media, sinusitis) and severe invasive (bacteremia/septicemia, meningitis) pneumococcal infection. A great deal of diverse factors related to pneumococcus biological features (virulence factors) as well individualized host-specific immunity are implicated in efficient bacterial penetration across the mucous membranes. The TLR signaling system plays a crucial role in the human nonspecific defense upon the first encounter with the pathogen. Various TLRs comprise the first pattern recognition receptor family ever described which sense ligands derived from the outer bacterial wall. The complement system is the ancient innate immunity component mainly involved in intravascular elimination of bacterial agents. In addition, the complement proteins serve as a bridge between innate and adaptive immunity, ensuring optimal conditions for B- and T-cell maturation and differentiation. Because pneumococcus secretes the IgA protease, a local protective effects related to IgA antibodies might not be so prominent. Therefore, B-cell immunodeficiency and impaired complement system hold a lead place among congenital causes resulting in severe and recurrent pneumococcal infections in children. Thus, based on available data, we concluded that impaired B-cell function, the complement components deficiency as well as receptor-recognition receptors (TLR-2, -9, -4, MYD88 adapter protein, TLR cascade enzymes: IRAK4, NEMO, NOD-like receptors: NOD2, NLRP3; C-type lectins: MBL, Dectin-2, and, possibly, ficoline) play the most important role among congenital immunodeficiencies predisposing to invasive and recurrent pneumococcal infections play the most important role among congenital immunodeficiencies predisposing to invasive and recurrent pneumococcal infections, and should be used as a rationale for immunological surveillance and organizing immunogenetics screening in these patients.

Key words: *pattern-recognition receptors, Toll-like receptors, pneumococcal infection, innate immunity, children.*

Около 30 лет назад выдающийся американский иммунолог Charles Janeway в своей статье «Приближение асимптоты? Эволюция и революция в иммунологии» высказал гипотезу о наличии в организме млекопитающих филогенетически более древней системы врожденного иммунитета, активирующей и регулирующей деятельность позднее сформированного адаптивного иммунитета [19]. Ученым была предложена гипотетическая модель наличия системы паттерн-распознающих рецепторов (англ. pattern-recognition receptors, PRRs), основными свойствами которых являются: 1) врожденно сформированная способность отличать чужеродные молекулы от собственных и 2) способность активировать адаптивный иммунитет после такого распознавания.

В последующие годы гипотеза была полностью подтверждена, было открыто огромное количество PRRs, способных распознавать консервативные молекулярные паттерны бактерий, вирусов, грибов, паразитов, простейших и собственных поврежденных клеток. К настоящему времени выделяют пять семейств PRRs, классифицированных по наличию общего протеинового домена (табл. 1), при этом некоторые семейства разделены на подсемейства. Так, например, суперсемейство лектинов С-типа со-

держит не только хорошо известный клиницистам С-реактивный протеин, но и более 1000 других молекул (у человека идентифицировано около 100), разделенных на 17 подсемейств [39]. Кроме наличия общего протеинового домена, PRRs могут быть классифицированы по своей локализации: рецепторы, ассоциированные с внешней цитоплазматической мембраной клетки, и молекулы, не имеющие такой связи, распознающие патогенные паттерны либо непосредственно в цитоплазме, либо в эндосомах (табл. 1 и рис.) [6].

Научное направление, изучающее врожденный иммунитет и PRRs, продолжает активно развиваться. Так, в последние годы были идентифицированы молекулы адаптеры, критически необходимые для передачи сигнала от рецептора к соответствующим энзимам (табл. 2). Были идентифицированы и детально описаны инфламмосомы — большие мультимолекулярные комплексы, включающие разные PRRs и формирующиеся в цитоплазме в ответ на контакт с патогеном и стрессорные стимулы [33]. Конечным итогом формирования канонических инфламмосом является каспаза-1-ассоциированный воспалительный процесс, гиперпродукция IL-1 β и IL-18, что приводит, в конечном итоге, к некротической

гибели инфицированной клетки (пироптозу). Врожденные дисфункции разнообразных PRRs были описаны при большом количестве инфекционных заболеваний, в том числе при пневмококковой инфекции у детей.

Капсульные формы грампозитивной бактерии *S. pneumoniae* (пневмококка) являются в настоящее время ведущей бактериальной причиной заболеваемости и смертности детей раннего возраста, особенно в развивающихся странах и в популяциях с низким социально-экономическим статусом. Во всем мире около 500 000 детей в возрасте до 5 лет умирают еже-

годно от пневмококковых инфекций, что превышает смертность в этом возрасте от других инфекционных заболеваний, включая ротавирусную диарею, малярию и туберкулез [13].

Бессимптомное носительство пневмококка очень широко распространено в детской популяции: до 40% детей младшего возраста, посещающих дошкольные учреждения, являются назофарингеальными носителями *S. pneumoniae* [5]. При отсутствии противопневмококковой вакцинации у значительной части носителей развиваются неинвазивные (пневмония, средний отит, синусит) и тяжелые ин-

Таблица 1. Семейства паттерн-распознающих рецепторов

Table 1. Pattern-recognition receptor families

Семейство Families	Члены семейства Family members	Общий протеиновый домен Common protein domain	Локализация рецепторов Receptor position
Toll-подобные рецепторы (TLR) Toll-like receptors (TLR)	У человека: TLR1–TLR11 (участвуют в инактивации бактерий, вирусов, грибов, паразитов, простейших, DAMPs) In human: TLR1–TLR11 (involved in the inactivation of bacteria, viruses, fungi, parasites, protozoa, DAMPs)	LRR, TIR	Цитоплазматическая мембрана, компартменты эндосом Cytoplasmic membrane, endosomal compartments
Лектины С-типа C-type lectin receptors, CLR	Включает 17 подсемейств: в т.ч. коллектины (маннозосвязывающий лектин, протеины сурфактанта), селектины, NK-рецепторы (Dectin-1), рецепторы макрофагов (Dectin-2) и др. Consists of 17 subfamilies: including collectins (mannose-binding lectin, surfactant proteins), selectins, NK-receptors (Dectin-1), macrophage receptors (Dectin-2) etc.	C-type lectin	Цитоплазматическая мембрана, плазма Cytoplasmic membrane, plasma
NOD-подобные рецепторы Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors, NLRs	Включает 4 подсемейства, представители: NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC3–5, NLRP1–9 и 11–14, NAIP1, -2, -5, -6 (участвуют в инактивации бактерий, некоторые участвуют в образовании инфламмосом) Consists of 4 subfamilies, Representatives: NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC3–5, NLRP1–9 and 11–14, NAIP1, -2, -5, -6 (involved in bacterial inactivation, some participate in the formation of inflammasome assembly)	Nucleotide binding, LRR	Цитоплазма, плазма, мембрана эндосом Cytoplasm, plasma, endosome membrane
RIG-подобные рецепторы Retinoic acid-inducible gene (RIG)-like receptor, RLRs	RIG-I, MDA5, LGP2 (участвуют в инактивации вирусов) RIG-I, MDA5, LGP2 (involved in virus inactivation)	DExD/H, helicase	Цитоплазма Cytoplasm
AIM-подобные рецепторы Absent in melanoma (AIM)-like receptors, ALRs	AIM2, IFI16 (участвуют в инактивации грибов, DAMPs, некоторые участвуют в образовании инфламмосом) AIM2, IFI16 (involved in fungal inactivation, DAMPs, some involved in the formation of inflammasome assembly)	PYRIN, HIN-200	Цитоплазма, ядра клеток Cytoplasm, cell nuclei

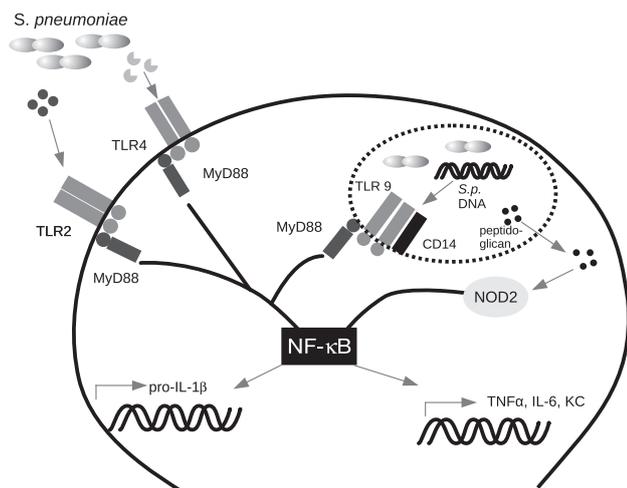


Рисунок. Некоторые паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), вовлеченные в механизм распознавания *S. pneumoniae*

Figure. Pattern-recognition receptors (PRRs) involved in recognition of *S. pneumoniae*

вазивные (бактериемия/септицемия, менингит) пневмококковые заболевания. 20–25% детей до 15 лет переносят как минимум один эпизод пневмококковой инфекции. Причем у некоторых детей регистрируются повторные эпизоды пневмококковых заболеваний, в том числе инвазивных. Основными известными предрасполагающими факторами инвазивных и рецидивирующих инфекций, вызванных *S. pneumoniae*, являются [16]:

- возраст ребенка до 2-х лет;
- спленэктомия;
- врожденная аспления;
- функциональная аспления (например, вследствие радиационного облучения, серповидноклеточной анемии);
- трансплантация органов;
- врожденные мальформации среднего и внутреннего уха;
- кохлеарный имплант;
- нарушения пассажа цереброспинальной жидкости;
- заболевания сердца (пороки «синего типа», сердечная недостаточность, операции на сердце);
- хронические легочные заболевания (например, муковисцидоз);
- заболевания, связанные с дисфункцией дыхательной мускулатуры (например, миопатии);
- нефротический синдром;
- приобретенная иммуносупрессия (ВИЧ-инфекция, лимфома);
- первичные иммунодефициты.

Среди перечисленных известных причин рецидивирующих инвазивных пневмококковых заболеваний наиболее частыми являются ана-

томические дефекты (нарушения пассажа цереброспинальной жидкости, врожденные мальформации среднего и внутреннего уха, пороки сердца) и иммунодефициты [17].

С тех пор как более 50 лет назад О. Bruton впервые описал врожденную агаммаглобулинемию, количество сообщений о первичных иммунодефицитах (ПИД) в медицинской литературе нарастало чрезвычайно высокими темпами, и к настоящему времени ПИД включают 354 нозологические единицы. Последний (2018 г.) пересмотр классификации ПИД, регулярно осуществляемый специальным экспертным комитетом The International Union of Immunological Societies (IUIS), предлагает 9 групп ПИД в зависимости от преобладающей локализации иммунного дефекта, патофизиологических и фенотипических особенностей [29]. Среди всего многообразия известных ПИД наибольшую роль в патогенетических механизмах формирования осложненных и рецидивирующих пневмококковых инфекций играют:

- дефекты В-клеточного звена иммунитета [7];
- дисфункции системы комплемента [32];
- дисфункции паттерн-распознающих рецепторов и их адаптеров (TLR2, NOD2, MYD88, MBL, Dectin-2 и др.) [24, 26].

Успешное проникновение пневмококка через слизистые оболочки зависит от большого количества факторов, как со стороны самой бактерии (факторов вирулентности), так и со стороны комплекса защитных компонентов иммунной системы организма-хозяина. Гидрофильная полисахаридная капсула предохраняет пневмококк от прямого поглощения фагоцитами в отсутствие серотип-специфических опсонизирующих антител и/или активации системы комплемента; важнейшим фактором защиты в этом случае являются Toll-подобные рецепторы второго типа (TLR2), которые связывают пептидогликаны микробной стенки и инициируют локальный и системный воспалительный процесс. Определенную роль в отсутствие специфических антител также могут играть и Т-лимфоциты; точные механизмы такого участия до конца не изучены [20]. В норме защитная роль слизистых оболочек очень высока, однако она может значительно снижаться при повреждении слизистых вирусами и сигаретным дымом.

После проникновения микроба в глубь слизистой оболочки происходит активация локальных тканевых В- и Т-лимфоцитов, которые при участии секреторного IgA мигрируют в системный кровоток и активируют клетки памяти и/или В-лимфоциты, после чего очень интенсивными темпами нарастает продукция специфических антител по Т-лимфоцит-

Таблица 2. Протеины-адаптеры паттерн-распознающих рецепторов

Table 2. Adaptor proteins linked to pattern-recognition receptors

Адаптеры Adaptor proteins	Взаимодействие с протеиновым доменом Adaptor protein domain involved	Локализация Cells position
TIRAP/MyD88	TIR домен TIR domain	Цитоплазматическая мембрана, компартменты эндосом Cytoplasmic membrane, endosomal compartments
TRAM/TRIF	TIR домен TIR domain	Цитоплазматическая мембрана, компартменты эндосом Cytoplasmic membrane, endosomal compartments
MAVS	CARD домен CARD domain	Мембраны митохондрий и пероксисом Mitochondria and peroxisomal membranes
ASC	PYRIN	Цитозоль, митохондрии Cytosol, mitochondria

независимому (IgG2, активируются полисахаридами бактерий) и, в меньшей степени, Т-лимфоцит зависимому (IgG1, активируются протеинами бактерий) путям. Клинико-иммунологические исследования показывают, что критически важную роль в дальнейшем фагоцитозе опсонизированных пневмококков, как и в реализации Т-лимфоцит-независимого пути продукции IgG2, играет селезенка. Как было указано выше, спленэктомия или функциональная аспления являются важнейшими приобретенными факторами предрасположенности к пневмококковым инфекциям; это же касается и других инкапсулированных бактерий, например, *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*.

Роль врожденных дефектов в системе Toll-подобных рецепторов (TLR) и протеинов-адаптеров в предрасположенности к пневмококковой инфекции

Система TLR сигналинга играет важнейшую роль в неспецифической защитной реакции организма человека при его первой встрече с патогеном. TLR различных типов относятся к первому из описанных семейств паттерн-распознающих мембранных молекул, для которых лигандами являются специфические участки внешней оболочки бактерий и вирусов — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (англ. pathogen associated molecular patterns — PAMPs), и участки поврежденных клеток (англ. danger associated molecular patterns — DAMPs).

В настоящее время известно 11 типов рецепторов TLR (TLR1–TLR11, табл. 3), экспрессирующихся на плазматических и эндосомальных мембранах различных клеток человека (в основном, макрофагов и дендритных клеток) [9]. Взаимодействие TLR с PAMPs и DAMPs приводит к запуску биохимического каскада,

инициирующего продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, непосредственно, без участия компонентов адаптивного иммунитета, формирующих молекулярно-клеточную сеть, элиминирующую патогены. Кроме того, TLR участвуют в модуляции различных звеньев адаптивного иммунитета. Как было указано выше, для рецидивирующего и тяжелого течения пневмококковых инфекций у детей особенно характерна врожденная дисфункция TLR второго типа (TLR2) [22]. В недавно проведенном российскими исследователями метаанализе было показано, что минорный аллель мутации rs5743708 гена *TLR2* сопряжен с предрасположенностью к пневмококковым пневмониям, а С-аллель *IL6* rs1800795 — с тяжелым пневмония-ассоциированным сепсисом, в то время как А-аллель *IL10* rs1800896 обладает протективным эффектом в отношении этих состояний [36]. В метаанализе, проведенном I. Patarcis и соавт. было показано, что полиморфизм гена *IL4* rs2070874 ассоциирован с широкой группой респираторных инфекций, а полиморфизм гена *TLR2* rs3804099 — с пневмонией [28].

Кроме TLR2 в противопневмококковой защите также могут активно участвовать TLR9 и TLR4 [24]. Так, было установлено, что дисфункция TLR9 играет важную роль в трансформации назофарингеального носительства *S. pneumoniae* в пневмококковый менингит [22]. Хотя считается, что TLR4 наибольшую активность проявляет в отношении грамотрицательных бактерий, некоторыми исследователями показана его защитная роль в отношении пневмококка [22, 24].

В последние годы было показано, что генетически детерминированный дефект продукции или активности ряда молекул TLR-каскада (протеинов-адаптеров) может приводить к недостаточной защитной реакции и снижать противoinфекционную функцию системы TLR. К таким потенциально дефектным молекулам относятся, в частности, interleukin-1-receptor associated kinase-4 (IRAK-4), myeloid differentiation factor 88

(MYD88) и nuclear factor- κ B essential modulator (NEMO) [9]. Так, было показано, что IRAK-4 дефицит приводит к предрасположенности к пневмококковым инфекциям [14], а IRAK-4 и MyD88 дефициты сопряжены с 40% летальностью в возрасте до 8 лет от инфекционных заболеваний [30]. В эксперименте с MyD88-дефицитными мышами было показано, что такие животные чрезвычайно подвержены инвазивным пневмококковым инфекциям [23].

Известные мутации гена NEMO затрагивают различные виды TLR; дети с таким дефектом предрасположены к тяжелому течению широкого круга бактериальных и вирусных инфекций с раннего возраста, а также нередко имеют эктодермальную дисплазию. Общим клиническим признаком указанных генетических дефектов является сниженный системный ответ на инфекцию: отсутствие лихорадки, лейкоцитоза и увеличения концентрации острофазовых белков даже при инвазивном бактериальном процессе.

Роль дисфункций паттерн-распознающих NOD-подобных рецепторов и инфламмасом в предрасположенности к пневмококковой инфекции

Семейство NOD-подобных рецепторов (NLRs) у человека насчитывает 23 протеина, локализованных преимущественно в цитоплазме (табл. 1 и рис.). Два наиболее изученных представителя семейства, NOD1 и NOD2, первоначально активируют NF- κ B-зависимый путь экспрессии провоспалительных генов. NOD1 обнаруживает пептидогликаны грамотрицательных бактерий, а NOD2 — пептидогликаны почти всех бактерий. NLRP1, NLRP3 и NLRC4 участвуют в формировании инфламмасом, приводящих к гиперпродукции IL-1 β , IL-18 и некротической гибели клетки после распознавания патогена.

Таблица 3. Toll-подобные рецепторы (TLR), их локализация и лиганды

Table 3. Toll-like receptors (TLR): position and ligands

Тoll-подобные рецепторы (TLRs) Toll-like receptors (TLRs)	Локализация TLRs TLR position	Основные лиганды TLRs TLR main ligands	Локализация основных лигандов TLRs Location of major TLR ligands
TLR1	Плазматическая мембрана Plasma membrane	Триацил-липопротеины Triacyl lipoproteins	Бактерии Bacteria
TLR2	Плазматическая мембрана Plasma membrane	Липопротеины Lipoproteins	Бактерии, вирусы, паразиты, собственные клетки Bacteria, viruses, parasites, host cells
TLR3	Эндолизосомы Endolysosomes	dsRNA	Вирусы Viruses
TLR4	Плазматическая мембрана Plasma membrane	Липополисахариды Lipopolysaccharides	Бактерии, вирусы, собственные клетки Viruses, bacteria, own cells
TLR5	Плазматическая мембрана Plasma membrane	Флагеллин Flagellin	Бактерии Bacteria
TLR6	Плазматическая мембрана Plasma membrane	Диацил-липопротеины Diacyl lipoproteins	Бактерии, вирусы Bacteria, viruses
TLR7 (TLR8 у человека) TLR7 (TLR8 — in human)	Эндолизосомы Endolysosomes	ssRNA	Вирусы, бактерии, собственные клетки Viruses, bacteria, host cells
TLR9	Эндолизосомы Endolysosomes	CpG-DNA	Вирусы, бактерии, простейшие, собственные клетки Viruses, bacteria, protozoa, host cells
TLR10	Эндолизосомы Endolysosomes	Неизвестно Unknown	Неизвестно Unknown
TLR11	Плазматическая мембрана Plasma membrane	Профилин-подобные молекулы Profilin-like molecules	Простейшие Protozoa

Проведенные исследования показывают важное участие NOD2 совместно с TLR2 и Th17 в механизмах клиренса при пневмококковой колонизации. Кроме того, NOD2-дефицит сопряжен с более агрессивным течением пневмококкового менингита [24]. В недавнем обзоре A. Rabes и соавт. показана критически важная роль канонических инфламмасом с участием паттерн-распознающих рецепторов NLRP3/AIM2 и адаптера ASC в механизмах противопневмококковой защиты [31].

Роль врожденного дефицита/дисфункции коллектинов в предрасположенности к пневмококковой инфекции

Лектины — общий термин протеинов, способных к распознаванию и агрегации молекул олиго- и полисахаридной природы. Среди всех лектинов уникальными функциями формирования комплексов с углеводными компонентами микробной стенки обладают фиколины и коллектины (маннозосвязывающий лектин (англ. mannose-binding lectin, MBL), печеночный и почечный коллектины) [1, 21, 38]. Общим доменом коллектинов является коллагеноподобный участок молекул [39]. Образование сложного комплекса «полисахариды микробной стенки + фиколин/коллектин + специфические протеазы» приводит, в итоге, к активации системы комплемента. Такой путь активации называется лектиновым, в отличие от двух других путей — классического и альтернативного.

Система комплемента — древнейший компонент врожденного иммунитета, основной функцией которого является преимущественно интраваскулярная элиминация бактериальных агентов. Кроме того, протеины комплемента играют роль своеобразного моста между системами врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивая адекватные условия для созревания и дифференциации В- и Т-лимфоцитов. Система комплемента состоит из плазменных протеинов и мембранных рецепторов. Плазменные протеины взаимодействуют между собой тремя известными каскадными путями — лектиновым (наиболее филогенетически древним), альтернативным и классическим.

Результаты изучения защитной роли MBL для таких актуальных для респираторного тракта возбудителей, как *S. pneumoniae* и *S. aureus*, довольно противоречивы [10]. Считается, что наличие капсулы у *S. pneumoniae* препятствует связыванию MBL с бактерией и снижает его комплемент-активирующий эффект. В то же время, в метаанализе D.P. Eisen и соавт. [11] было показано увеличение риска летального исхода у пациентов с пневмококковым сепсисом, имевших плазменный уровень MBL < 0,5 мкг/мл. Такая за-

висимость сохранялась после поправки на пневмококковую бактериемию и коморбидные заболевания. Исследователи из Великобритании показали значительное увеличение риска инвазивной пневмококковой инфекции при наличии MBL-дефицита; показатель отношения шансов составил 2,59 (1,39–4,83, $p = 0,002$) [35]. В недавнем метаанализе, проведенном I. Patarsis и соавт. [28] было показано, что полиморфизм гена *MBL2* rs7095891 сопряжен с общим, без привязки к этиологии, риском развития пневмоний.

Фиколины — лектин-распознающие молекулы, структурно и функционально гомологичные MBL. Описано три вида фиколинов: L-фиколин, кодирующийся геном *FCN2*, M-фиколин (*FCN1*) и H-фиколин (*FCN3*). L-фиколин продуцируется в печени и циркулирует в крови, M-фиколин — исключительно тканевая молекула (экспрессируется в легких, моноцитах и селезенке), H-фиколин экспрессируется в печени и легких. Показано, что в легких в наибольшей степени продуцируется H-фиколин, а его комплементсвязывающая способность превышает таковую MBL [10]. Показаны значительные популяционные различия в распределении генотипов гена *FCN2*, предположительно ассоциированные с его концентрацией и функциональной активностью [37].

Структура фиколинов очень похожа на структуру MBL и также содержит домен, авидный к тем же углеводным компонентам бактерий, что и MBL. Однако фиколины, в отличие от MBL, дополнительно могут связывать некоторые компоненты инкапсулированных грамположительных бактерий, в частности *S. pneumoniae* (в том числе капсульные формы) и *S. aureus* [25]. Описаны полиморфизмы промоторных и структурных регионов генов фиколинов, однако, если полиморфизмы генов *MBL2* обуславливают 1000-кратные различия его концентрации, то полиморфизмы генов *FCN2* и *FCN3* ответственны только за 20-кратные различия, а случаев полного отсутствия фиколинов (нулевые плазменные уровни), в отличие от MBL, к настоящему времени не зафиксировано. Роль дефицита фиколинов в предрасположенности к пневмококковой инфекции у человека к настоящему времени полноценно не изучена, хотя исследования на мышинных моделях показывают критически важную необходимость фиколинов в осуществлении противопневмококковой иммунной защиты [3, 12].

Кроме коллектинов, в элиминации *S. pneumoniae* принимают участие и другие паттерн-распознающие рецепторы, относящиеся к суперсемейству CLR (табл. 1). Так, в эксперименте с Dectin-2 (dendritic cell-associated C-type lectin-2) дефицитными мышами было показано, что этот рецептор критически необходим для осуществления иммунологической защиты от инвазии *S. pneumoniae* 3 серотипа [2].

Роль компонентов адаптивного иммунитета в патогенезе осложненных и рецидивирующих пневмококковых заболеваний у детей

Поскольку пневмококк секретирует IgA-протеазу, защитная роль локально продуцируемых антител класса IgA при реализации активного инфекционного процесса в этом случае невелика: значительно большую роль играет здесь опсонизация бактерии комплексом, состоящим из специфических IgG2 и компонентов системы комплемента. Именно поэтому дефекты адаптивного В-клеточного звена иммунитета и системы комплемента занимают ведущую позицию среди наследственно обусловленных причин тяжелого и рецидивирующего течения пневмококковых инфекций у детей [18]. Наиболее частыми генетическими дисфункциями В-лимфоцитов, ассоциированными с предрасположенностью к пневмококковым инфекциям, являются общий вариабельный иммунодефицит (ОВИД) и врожденные дефициты подклассов IgG [18, 27, 34].

У иммунокомпетентных детей уровень защитных противопневмококковых антител наиболее низок в возрасте до 2-х лет, повышается с ростом ребенка и достигает плато к взрослому периоду [15]. При наличии ОВИД, сопряженного с нарушением созревания и дифференцировки В-лимфоцитов, не происходит возрастного увеличения продукции специфических противопневмококковых антител. Первые проявления ОВИД в виде рецидивирующих бактериальных инфекций обычно появляются в возрасте 20–40 лет, хотя могут наблюдаться и в детском возрасте. Основным лабораторным признаком заболевания является снижение плазменных уровней двух классов иммуноглобулинов — IgA и IgG (иногда также и IgM), при нормальном или субнормальном содержании основных клеточных субпопуляций лимфоцитов.

Около 90% случаев ОВИД обусловлено неизвестными к настоящему времени спорадическими мутациями. Очень редко болезнь может иметь аутосомно-рецессивный или аутосомно-доминантный типы наследования. Лишь около 10% случаев ОВИД сопряжены с известными к настоящему времени мутациями. По меньшей мере 13 генов ассоциированы с ОВИД; с наибольшей частотой встречается мутация в гене, кодирующем продукцию поверхностного сигнального протеина В-лимфоцитов — *TNFRSF13B*. Известны также и мутации в генах *CD19*, *CD81*, *CR2*, *ICOS*, *IKZF1*, *IL21*, *LRBA*, *MS4A1*, *NFKB1*, *NFKB2*, *PRKCD*, *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C*. В значительном количестве случаев количественный дефицит иммуноглобули-

нов при ОВИД сопровождается качественным дефектом — дефицитом соматических гипермутаций легких цепей антител, что удобно использовать для лабораторного скрининга заболевания [4, 18].

Врожденные дефициты подклассов IgG также могут приводить к предрасположенности к инфекциям, вызванным инкапсулированными бактериями. Лабораторно данный вид ПИД характеризуется низким уровнем подклассов IgG (наиболее часто IgG2/IgG3) и сопутствующим снижением продукции антител против вакцинальных антигенов при нормальном уровне общего плазменного IgG. Исследование Н. Ingels и соавт. датской когорты детей с пневмококковыми инфекциями показало, что среди 15 детей с рецидивами инвазивной формы заболевания без классических факторов риска у 6 (40%) имелся сниженный антительный ответ на противопневмококковую вакцинацию [18].

Роль дисфункции классического пути активации комплемента в патогенезе осложненных и рецидивирующих пневмококковых заболеваний у детей

Классический путь активации комплемента инициируется взаимодействием антителосодержащих иммунных комплексов с субкомпонентом комплемента C1q, а лектиновый, как и альтернативный, не требуют наличия специфических антител. Все три пути активации ведут к одному важнейшему событию: расщеплению центрального компонента системы комплемента — протеина C3 с образованием его фрагмента C3b, который опсонизирует чужеродные клетки, подготавливая их к последующему фагоцитозу. Одновременно активируются «поздние» компоненты комплемента (C5–C9), обладающие непосредственной цитолитической активностью без участия фагоцитирующих клеток.

Генетически детерминированные дефициты компонентов системы комплемента ассоциированы с предрасположенностью к самым различным бактериальным инфекциям. Врожденный дефицит компонентов классического пути активации комплемента, особенно гомозиготный дефицит C2, сопряжены с предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям и инфекциям, вызываемым инкапсулированными бактериями — *S. pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Кроме C2, с предрасположенностью к инвазивному течению указанных инфекций ассоциированы также дефициты таких компонентов классического пути активации комплемента, как C1Q, C1R, C1S, C4 [8]. Дефицит терминальных компонентов (C5–C9) сопряжен с пред-

расположенностью к инфекциям, вызванным *N. meningitidis*. В уже упоминавшемся исследовании Н. Ingels и соавт. датской когорты детей с пневмококковыми инфекциями было показано, что среди 15 детей с рецидивами инвазивной формы заболевания без классических факторов риска у 6 (40%) имелись лабораторные признаки дефицита С2-компонента комплемента [18].

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные показывают наличие врожденных особенностей иммунного реагирования, предрасполагающих к рецидивирующему и инвазивному течению пневмококковых инфекций у детей. Наибольшее значение имеют такие врожденные состояния, как дефекты В-клеточного

звена иммунитета в виде изолированного дефицита продукции специфических IgG2 и ОВИД, дефицит С2-компонента классического пути активации комплемента и дисфункция паттерн-распознающих рецепторов (Toll-подобные рецепторы: TLR-2, -9, -4; протеина-адаптера MYD88; ферментов TLR-каскада: IRAK4, NEMO; NOD-подобных рецепторов: NOD2, NLRP3; лектинов С-типа: MBL, Dectin-2, а также, возможно, фиколина). Указанные данные целесообразно использовать при планировании иммунологического тестирования детей с инвазивными и рецидивирующими пневмококковыми инфекциями и организации иммуногенетических исследований в этой области.

Список литературы/References

1. Терещенко С.Ю., Каспаров Э.В., Смольникова М.В., Кувшинова Е.В. Дефицит маннозосвязывающего лектина при заболеваниях респираторного тракта // Пульмонология. 2016. Т. 26, № 6. С. 748–752. [Tereshchenko S.Yu., Kasparov E.V., Smolnikova M.V., Kuvshinova E.V. Deficiency of mannose-binding lectin in diseases of the respiratory tract. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 748–752. doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-6-748-752 (In Russ.)]
2. Akahori Y., Miyasaka T., Toyama M., Matsumoto I., Miyahara A., Zong T., Ishii K., Kinjo Y., Miyazaki Y., Saijo S., Iwakura Y., Kawakami K. Dectin-2-dependent host defense in mice infected with serotype 3 *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Immunol.*, 2016, vol. 17: 1. doi: 10.1186/s12865-015-0139-3
3. Ali Y.M., Lynch N.J., Haleem K.S., Fujita T., Endo Y., Hansen S., Holmskov U., Takahashi K., Stahl G.L., Dudler T., Girija U.V., Wallis R., Kadioglu A., Stover C.M., Andrew P.W., Schwaebler W.J. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.*, 2012, vol. 8, no. 7: e1002793. doi: 10.1371/journal.ppat.1002793
4. Andersen P., Permin H., Andersen V., Schejbel L., Garred P., Svejgaard A., Barington T. Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immunodeficiency. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 2, pp. 511–517. doi: 10.1182/blood-2003-12-4359
5. Bogaert D., De Groot R., Hermans P.W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.*, 2004, vol. 4, no. 3, pp. 144–154. doi: 10.1016/S1473-3099(04)00938-7
6. Brubaker S.W., Bonham K.S., Zanoni I., Kagan J.C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, 2015, vol. 33, pp. 257–290. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
7. Carneiro-Sampaio M., Coutinho A. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 4, pp. 1545–1555. doi: 10.1128/IAI.00787-06
8. Chapman S.J., Hill A.V. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat. Rev. Genet.*, 2012, vol. 13, no. 3, pp. 175–188. doi: 10.1038/nrg3114
9. De Nardo D. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 2015, vol. 74, no. 2, pp. 181–189. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.025
10. Eisen D.P. Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection. *J. Innate Immun.*, 2010, vol. 2, no. 2, pp. 114–122. doi: 10.1159/000228159
11. Eisen D.P., Dean M.M., Boermeester M.A., Fidler K.J., Gordon A.C., Kronborg G., Kun J.F., Lau Y.L., Payeras A., Valdimarsson H., Brett S.J., Ip W.K., Mila J., Peters M.J., Saevardottir S., Van Till J.W., Hinds C.J., McBryde E.S. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 47, no. 4, pp. 510–516. doi: 10.1086/590006
12. Endo Y., Takahashi M., Iwaki D., Ishida Y., Nakazawa N., Kodama T., Matsuzaka T., Kanno K., Liu Y., Tsuchiya K., Kawamura I., Ikawa M., Waguri S., Wada I., Matsushita M., Schwaebler W.J., Fujita T. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Immunol.*, 2012, vol. 189, no. 12, pp. 5860–5866. doi: 10.4049/jimmunol.1200836
13. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age. *World Health Organization*, 2012. URL: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/en
14. Gobin K., Hintermeyer M., Boisson B., Chrabieh M., Gandil P., Puel A., Picard C., Casanova J.L., Routes J., Verbsky J. IRAK4 Deficiency in a patient with recurrent pneumococcal infections: case report and review of the literature. *Front. Pediatr.*, 2017, vol. 5: 83. doi: 10.3389/fped.2017.00083
15. Goldblatt D. Immunisation and the maturation of infant immune responses. *Dev. Biol. Stand.*, 1998, vol. 95, pp. 125–132.
16. Hjuler T., Wohlfahrt J., Staum Kaltoft M., Koch A., Biggar R.J., Melbye M. Risks of invasive pneumococcal disease in children with underlying chronic diseases. *Pediatrics*, 2008, vol. 122, no. 1, pp. e26–32. doi: 10.1542/peds.2007-1510
17. Ingels H.A. Recurrent invasive pneumococcal disease in children — host factors and vaccination response. *Dan. Med. J.*, 2015, vol. 62, no. 7.
18. Ingels H., Schejbel L., Lundstedt A.C., Jensen L., Laursen I.A., Ryder L.P., Heegaard N.H., Konradsen H., Christensen J.J., Heilmann C., Marquart H.V. Immunodeficiency among children with recurrent invasive pneumococcal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 644–651. doi: 10.1097/INF.0000000000000701

19. Janeway C.A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1989, vol. 54, pp. 1–13.
20. Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, vol. 6, no. 4, pp. 288–301. doi: 10.1038/nrmicro1871
21. Kilpatrick D.C., Chalmers J.D. Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, vol. 2012: 138797. doi: 10.1155/2012/138797
22. Klein M., Obermaier B., Angele B., Pfister H.W., Wagner H., Koedel U., Kirschning C.J. Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, no. 7, pp. 1028–1036. doi:10.1086/591626
23. Koedel U., Rupprecht T., Angele B., Heesemann J., Wagner H., Pfister H.W., Kirschning C.J. MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain*, 2004, vol. 127, pt. 6, pp. 1437–1445. doi: 10.1093/brain/awh171
24. Koppe U., Suttorp N., Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol.*, 2012, vol. 14, no. 4, pp. 460–466. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x
25. Krarup A., Sorensen U.B., Matsushita M., Jensenius J.C., Thiel S. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 2, pp. 1052–1060. doi: 10.1128/IAI.73.2.1052-1060.2005
26. Ku C.L., Picard C., Erdos M., Jeurissen A., Bustamante J., Puel A., Von Bernuth H., Filipe-Santos O., Chang H.H., Lawrence T., Raes M., Marodi L., Bossuyt X., Casanova J.L. IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease. *J. Med. Genet.*, 2007, vol. 44, no. 1, pp. 16–23. doi: 10.1136/jmg.2006.044446
27. Oksenhendler E., Gerard L., Fieschi C., Malphettes M., Mouillot G., Jaussaud R., Viallard J.F., Gardembas M., Galicier L., Schleinitz N., Suarez F., Soulas-Sprauel P., Hachulla E., Jaccard A., Gardeur A., Theodorou I., Rabian C., Debre P., Group D.S. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 46, no. 10, pp. 1547–1554. doi: 10.1086/587669
28. Patarcic I., Gelemanovic A., Kirin M., Kolcic I., Theodoratou E., Baillie K.J., De Jong M.D., Rudan I., Campbell H., Polasek O. The role of host genetic factors in respiratory tract infectious diseases: systematic review, meta-analyses and field synopsis. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 16119. doi: 10.1038/srep16119
29. Picard C., Bobby Gaspar H., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., Crow Y.J., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., Ochs H.D., Oksenhendler E., Puck J., Tang M.L.K., Tangye S.G., Torgerson T.R., Sullivan K.E. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J. Clin. Immunol.*, 2018, vol. 38, no. 1, pp. 96–128. doi:10.1007/s10875-017-0464-9
30. Picard C., Casanova J.L., Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I kappa B alpha deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, vol. 24, no. 3, pp. 490–497. doi: 10.1128/CMR.00001-11
31. Rabes A., Suttorp N., Opitz B. Inflammasomes in pneumococcal infection: innate immune sensing and bacterial evasion strategies. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 2016, vol. 397, pp. 215–227. doi: 10.1007/978-3-319-41171-2_11
32. Ram S., Lewis L.A., Rice P.A. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, vol. 23, no. 4, pp. 740–780. doi: 10.1128/CMR.00048-09
33. Rathinam V.A.K., Chan F.K. Inflammasome, inflammation, and tissue homeostasis. *Trends Mol. Med.*, 2018. doi: 10.1016/j.molmed.2018.01.004
34. Resnick E.S., Moshier E.L., Godbold J.H., Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 7, pp. 1650–1657. doi: 10.1182/blood-2011-09-377945
35. Roy S., Knox K., Segal S., Griffiths D., Moore C.E., Welsh K.I., Smarason A., Day N.P., Mcpheat W.L., Crook D.W., Hill A.V., Oxford Pneumococcal Surveillance G. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet*, 2002, vol. 359, no. 9317, pp. 1569–1573. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08516-1
36. Smelaya T.V., Belopolskaya O.B., Smirnova S.V., Kuzovlev A.N., Moroz V.V., Golubev A.M., Pabalan N.A., Salnikova L.E. Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, pp. 35021. doi: 10.1038/srep35021
37. Smolnikova M.V., Freidin M.B., Tereshchenko S.Y. The prevalence of the variants of the L-ficolin gene (FCN2) in the arctic populations of East Siberia. *Immunogenetics*, 2017, vol. 69, no. 6, pp. 409–413. doi: 10.1007/s00251-017-0984-8
38. Trolldborg A., Hansen A., Hansen S.W., Jensenius J.C., Stengaard-Pedersen K., Thiel S. Lectin complement pathway proteins in healthy individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, vol. 188, no. 1, pp. 138–147. doi: 10.1111/cei.12909
39. Zelensky A.N., Gready J.E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.*, 2005, vol. 272, no. 24, pp. 6179–6217. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x

Авторы:

Терещенко С.Ю., д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением соматического и психического здоровья детей НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;
Смольникова М.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и физиологии НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Tereshchenko S.Yu., PhD, MD (Medicine), Head of Clinical Department of Childhood Somatic and Mental Health, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Pathology and Physiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.03.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 13.03.2019

Received 06.03.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 13.03.2019

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Е.Р. Черных, Е.А. Олейник, О.Ю. Леплина, Н.М. Старостина, А.А. Останин

ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (HCV), является серьезной проблемой здравоохранения, поскольку в большинстве случаев (до 85%) приобретает хроническое течение и повышает риск развития цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и выраженных внепеченочных осложнений. Причины хронизации инфекции во многом связаны с недостаточностью противовирусного иммунного ответа. Эффективная элиминация вируса требует ранней активации врожденного иммунитета, индукции сильного HCV-специфического мультиэпитопного Т-клеточного ответа и формирования продолжительной иммунологической памяти. Дендритные клетки (DC), которые представляют гетерогенную популяцию антиген-презентирующих клеток, являются продуцентами интерферонов первого типа, способны активировать натуральные киллерные клетки и индуцировать адаптивный иммунный ответ, выполняя, таким образом, важную роль в противовирусной защите. При этом нарушение функций DC при HCV-инфекции рассматривается в качестве одного из механизмов, позволяющих вирусу избежать иммунного надзора. Настоящий обзор включает современные данные, характеризующие роль DC в иммунном ответе при HCV-инфекции и освещает ряд ключевых вопросов, касающихся изменений фенотипа и функций различных субпопуляций DC у пациентов с вирусным гепатитом С, механизмов нарушения функциональной активности DC и перспектив лечения хронического гепатита С на основе использования генерированных *ex vivo* DC.

Ключевые слова: дендритные клетки, mDC, pDC, mo-DC, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, Т-клеточный ответ, HCV-антигены, DC вакцины, HCV-инфекция.

DENDRITIC CELLS IN THE PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS C

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Starostina N.M., Ostanin A.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Infection with hepatitis C virus (HCV) is a public health problem; it establishes a chronic course in most (up to 85%) infected patients and increases the risk for developing liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and severe extrahepatic manifestations. The mechanisms of HCV persistence are largely related to the inefficient antiviral response of the host immune system. The effective clearance of the virus requires early activation of innate immune system together with the induction of a strong multiepitopic adoptive T cell response and long-term antiviral memory. Dendritic cells (DCs), which represent a heterogeneous population of antigen-presenting cells, contribute to the production of type I interferon, activate natural killer cells and induce adoptive immune response thus playing a major role in antiviral defense. In this case, DCs dysfunction in HCV-infection is considered to be the one of the mechanism that allows the virus to escape from the immune surveillance. The present review includes current data focusing on the role of DCs in the anti-HCV immune response and highlights a number of key issues related to the phenotypic and functional changes of various DC subpopulations in HCV-infection, the mechanisms of DC impairments and the prospects for treatment of chronic hepatitis C based on the use of *ex vivo* generated DCs.

Key words: dendritic cells, mDCs, pDCs, mo-DCs, innate immunity, adaptive immunity, T cell response, HCV-antigens, DC vaccines, HCV-infection.

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.
Тел.: 8 (383) 236-03-29. Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Contacts:

Elena R. Chernykh
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14,
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology.
Phone: +7 (383) 236-03-29. Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Библиографическое описание:

Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Останин А.А.
Дендритные клетки в патогенезе вирусного гепатита С // Инфекция
и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 239–252. doi: 10.15789/2220-7619-2019-
2-239-252

Citation:

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Starostina N.M., Ostanin A.A.
Dendritic cells in the pathogenesis of viral hepatitis C // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2,
pp. 239–252. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-239-252

© Черных Е.Р. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-239-252>

Введение

Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (HCV), относится к трансмиссивным инфекциям и приводит к прогрессирующему поражению печени. Острые формы HCV инфекции имеют стертое клиническое течение, манифестируют подъемом аланинаминотрансферазы и виремией и диагностируются довольно редко [78]. Ранний иммунный ответ, включающий активацию натуральных киллерных (NK) клеток, развитие сильного мультиэпитопного HCV-специфического ответа CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и появление HCV-специфических антител при острой HCV-инфекции способен привести к элиминации вируса [45]. Однако в большинстве случаев (до 85%) HCV вызывает персистирующую инфекцию с незаметным дебютом и малыми клиническими проявлениями на протяжении многих лет, и число пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) в мире варьирует от 64 до 103 млн [59]. Несмотря на асимптомное начало, болезнь через несколько десятилетий приводит к развитию хронического гепатита, с возможностью трансформации в цирроз печени и возникновения гепатоцеллюлярной карциномы. Хроническая HCV-инфекция также часто сопровождается внепеченочными осложнениями со стороны кожи, суставов и почек [4]. В настоящее время золотым стандартом лечения HCV-инфекции является комбинированная терапия препаратами интерферонов и рибавирином, которая позволяет добиться успеха у 40–60% пациентов [2]. Большие надежды также возлагаются на таргетную терапию ингибиторами протеаз [96]. Тем не менее, эти подходы не предотвращают реинфицирования и доступны лишь для малой части больных ХГС в связи с существенными ограничениями по генотипу вируса (генотип 1), наличием выраженных побочных эффектов и высокой стоимостью.

Характеристика HCV

HCV относится к семейству флавириусов и представляет молекулу одноцепочечной РНК протяженностью около 9400 нуклеотидов. Репликация вируса происходит в эндоплазматическом ретикулуме инфицированного гепатоцита. HCV характеризуется высокой генетической вариабельностью. Выделяют 7 генотипов вируса, которые отличаются нуклеотидной последовательностью на 33%, и множество подтипов (квазивидов) в пределах одного генотипа, имеющие различия около 11% нуклеотидных остатков [83]. Такое генетическое разнообразие помогает вирусу избежать действия нейтрализующих антител. Вирус кодирует полипептид, который расщепляется протеазами на 3 структурных и 6 неструктурных белков. Структурные

белки включают гликопротеины оболочки E1 и E2, которые обеспечивают связывание вируса с клетками, и вирусный нуклеокапсидный белок Core, участвующий в формировании вирусной частицы. Неструктурные белки (NS2-NS5), обладающие ферментативной активностью, участвуют в процессах репликации вируса [25]. Все вирусные белки содержат эпитопы, распознаваемые В-клетками, хелперными CD4⁺ и цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами. При этом в силу высокой изменчивости вируса, иммуносупрессивного микроокружения в печени, иммуномодулирующей активности вирусных белков и индукции Т-клеточного истощения в условиях высокой вирусной нагрузки HCV обладает уникальными способностями эффективно ускользать от иммунного надзора [12, 15, 26].

Роль дендритных клеток (DC) в противовирусном ответе

Противовирусный ответ включает две линии защиты. Первая линия осуществляется клетками и факторами врожденного иммунитета. Распознавание цитозольной HCV РНК паттерн-распознающими рецепторами индуцирует секрецию интерферонов (IFNs), которые вызывают деградацию вирусной РНК и препятствуют репликации вирусов [36]. Интерфероны I и III типа стимулируют NK-клетки к лизису инфицированных гепатоцитов. При этом высвобождающиеся из разрушенных гепатоцитов вирусные антигены презентуются CD4 и CD8 Т-лимфоцитам, что запускает адаптивный иммунный ответ (вторая линия защиты). Сильный, мультиспецифичный и устойчивый ответ цитотоксических CD8 Т-клеток обеспечивает полную элиминацию вируса, тогда как слабый и непродолжительный ответ способствует персистенции вируса [45, 51].

Субпопуляции DC человека

Дендритные клетки представляют гетерогенную популяцию клеток, различающихся по локализации, происхождению и функциям. Костномозговые предшественники DC, попадают в кровь и дают начало резидентным и циркулирующим DC, подверженным впоследствии дифференцировке *in situ*. Резидентные DC локализуются в лимфатической ткани, где они захватывают и презентуют Т-клеткам антигены, содержащиеся в крови и лимфе. DC нелимфоидных тканей конститутивно мигрируют из тканей в лимфоузлы и презентуют Т-клеткам тканевые антигены. По происхождению выделяют миелоидные и плазмацитоидные DC. Миелоидные или «обычные» (conventional) DC (mDC) образуются из гранулоцитарно-макрофагального костномозгового предшественника и разделяются

на две субпопуляции: mDC-1, экспрессирующие CD11c и BDCA-1, и mDC-2, несущие на своей поверхности CD141 и BDCA-3. Плазмацитоидные DC (pDC) образуются из мультилимфоцитарного предшественника костного мозга и несут на своей поверхности BDCA-2 и BDCA-4 [19]. В периферической крови субпопуляция mDC-2 составляет 5–10% от общего пула циркулирующих DC, тогда как на долю pDC и mDC-1 приходится 45%. Указанные субпопуляции также обнаруживаются в селезенке и миндалинах [13, 102]. DC миелоидного происхождения могут также дифференцироваться из моноцитов. Такие DC, названные «неклассическими» mDC или DC моноцитарного происхождения (moDC), были описаны в тканях и лимфоидных органах в виде третьей субпопуляции CD11c⁺ mDC, и первоначально обозначены как интерстициальные DC. Мо-DC более похожи на моноциты и макрофаги, чем mDC-1и mDC-2, возникают из «классических» CD14⁺CD16⁻ моноцитов, и их количество возрастает при инфекции и воспалении [19].

Роль DC в противовирусной защите

Дендритные клетки вовлекаются в противoinфекционный иммунный ответ с самого начала инфекционного процесса, и во многом определяют исход инфекции. Функции DC сводятся к 1) распознаванию вирусных РНК и/или белков; 2) запуску продукции интерферонов, провоспалительных цитокинов и хемокинов; 3) активации NK-клеток; 4) презентации вирусных антигенов Т-клеткам; 5) запуску и регуляции адаптивного Т-клеточного ответа. Реализация этих функций осуществляется с вовлечением различных типов DC. Так, pDC являются основными продуцентами интерферонов I типа [101]; классические mDC играют важную роль в антигенной презентации [41]; минорная популяция mDC-2 рассматривается в качестве важного источника продукции интерферона III типа (IFN λ) [98].

Распознавание вирусных структур DC

Патогенные микроорганизмы характеризуются наличием молекулярных структур, полу-

чивших название патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), которые распознаются с помощью паттерн-распознающих рецепторов (PRRs). PRRs представлены несколькими семействами рецепторов и включают Toll-подобные рецепторы (TLRs), NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-подобные рецепторы (RLRs) и лектиновые рецепторы С типа [1]. PRRs, экспрессируемые на DC, являются сенсорами одноцепочечной (ssRNA) и двуцепочечной вирусной РНК (dsRNA), а также структурных и неструктурных вирусных белков [38, 52]. В эндосомальном компартменте полиуридиновые мотивы ssRNA и петли dsRNA распознаются соответственно TLR-3 и TLR-7/8 (табл. 1). В цитоплазме dsRNA распознается RIG-подобными рецепторами RIG-I и MDA5. Активация TLR- и RLR-сигнальных путей приводит к активации транскрипционных факторов IRFs, AP-1 и NF- κ B и запуску транскрипции генов воспалительного ответа и интерферонов. NLRs также активируются в присутствии вирусной РНК. В частности, NLR участвующий в формировании инфламмосом, распознает dsRNA и ssRNA, и запуск NLRP3-сигнального пути активирует каспазу-1 и секрецию провоспалительного IL-1 β [76]. Структурные и неструктурные HCV белки (Core, NS3, NS5A) также выступают в роли PAMPs и распознаются TLRs (TLR-1, -2, -4, -5 и -6). Так, TLR-2 и TLR-4, которые экспрессируются на mDC-1, являются сенсорами для Core/NS3 и NS5 соответственно.

Распознавание вирусных PAMPs паттерн-распознающими рецепторами DC индуцирует продукцию интерферонов и провоспалительных цитокинов. Плазмацитоидные DC распознают ssRNA через TLR-7, сигналинг через который повышает экспрессию HLA-DR и костимуляторных молекул (CD80, CD86), активирует секрецию IFN α/β и индуцирует Th1-стимулирующую активность DC [88, 91]. Продуктируемый pDC IFN α , в свою очередь, способен усиливать экспрессию MHC антигенов I/II класса и костимуляторных молекул на незрелых moDC и индуцировать продукцию IL-12 и TNF α без усиления синтеза IL-10 [10]. Связывание вирусной РНК

Таблица 1. Паттерн-распознающие рецепторы DC при вирусном гепатите С

Table 1. Pattern recognition receptors of DC in viral hepatitis C

PAMPs/локализация PRRs PAMPs/localization of PRRs	TLRs							RLRs and NLRs	
	Поверхность клетки Cell surface					Эндосомальный компартмент Endosomal compartment		Цитоплазма Cytoplasm	
	TLR-1	TLR-2	TLR-4	TLR-5	TLR-6	TLR-7, TLR-8	TLR-3	RIG-1, MDA5	NLRP3
Core	+	+	+	-	-	-	-	-	-
NS3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
NS5A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ssRNA	-	-	-	-	-	+	-	+	+
dsRNA	-	-	-	-	-	-	+	+	+

с TLR стимулирует также pDC к продукции $IFN\lambda$ [84]. Однако ключевым источником $IFN\lambda$, играющего ведущую роль в подавлении вируса, являются mDC-2 [98]. Данный тип DC характеризуется высокой экспрессией TLR-3 и низким уровнем TLR-7/9, и запуск секреции $IFN\lambda$ индуцируется взаимодействием dsRNA с TLR-3 [100]. Субпопуляция mDC-2 при совместном культивировании с HCV-инфицированными гепатоцитами демонстрирует высокий уровень продукции $IFN\lambda$. Дендритные клетки, активированные через TLR-3, -7 или -9 также секретируют IL-12 — цитокин, усиливающий дифференцировку Th1 и продукцию $IFN\gamma$. Распознавание различных структурных и неструктурных пептидов через TLR-2 активирует секрецию IL-10, который поддерживает дифференцировку Th2 [76].

Активация NK-клеток

Цитокины, продуцируемые DC, способны активировать и усиливать функции NK-клеток, которые являются одними из самых ранних иммунных респондеров при HCV-инфекции. Противовирусная активность NK обусловлена различными механизмами. NK-клетки продуцируют $IFN\beta$, $IFN\gamma$ и $TNF\beta$, которые усиливают экспрессию интерферон-стимулированных генов, подавляют вирусную репликацию, индуцируют созревание DC, стимулируют продукцию хемокинов и рекрутирование иммунных клеток. Кроме того, NK способны лизировать инфицированные гепатоциты, а также защищать T-клетки от состояния истощения [17, 27, 93]. Продуцируемые DC $IFN\alpha$, IL-12 и IL-15 поддерживают активацию и выживаемость NK-клеток, а также стимулируют их цитотоксическую активность и продукцию $IFN\gamma$. DC экспрессируют MICA/B, которые являются лигандами для NKG2D рецепторов NK клеток. Исследования *in vitro* показали, что контактное взаимодействие $IFN\beta$ -стимулированных mo-DC с NK-клетками усиливает способность последних продуцировать $IFN\gamma$ и их цитотоксичность [39, 76].

Презентация вирусных белков и запуск адаптивного ответа

Известно, что важную роль в элиминации вируса играет адаптивный T-клеточный ответ. Исследования на шимпанзе и у пациентов со статусом выздоровления после острой HCV-инфекции показывают, что элиминация вируса ассоциирована с сильным продолжительным мультиэпитопным ответом $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клеток [63]. Несмотря на высокую вариабельность вирусного генома, вирус экспрессирует ряд высококонсервативных структурных и неструктурных белков, содержащих HCV-специфические эпитопы, распознаваемые $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клетками [74].

Дендритные клетки играют ведущую роль в инициации противовирусного ответа. Незре-

лые DC не способны эффективно активировать T-клетки, но обладают высокой эндоцитарной активностью. После контакта с патогеном DC созревают и мигрируют в ближайшие лимфоузлы, где презентуют антиген T-клеткам. Созревание DC является критическим моментом для презентации антигена, поскольку на этом этапе происходит усиление экспрессии антигенов MHC и костимуляторных молекул, а также продукции цитокинов, необходимых для активации и дифференцировки наивных T-клеток [50].

Дендритные клетки являются наиболее «профессиональными» антигенпрезентирующими клетками. Благодаря высокой экспрессии антигенов гистосовместимости I и II класса (MHC-I и MHC-II) и костимуляторных молекул, медленной внутриклеточной деградации патогена и длительной презентации антигенных пептидов на клеточной мембране, DC превышают активность других антигенпрезентирующих клеток и способны презентовать антигены наивным T-клеткам [8]. Учитывая также способность DC продуцировать хемокины и иммунорегуляторные цитокины, детерминирующие тип рекрутируемых T-клеток и направленность их дифференцировки в Th1, Th2 или цитотоксические T-клетки [72, 89], очевидно, что DC играют ключевую роль в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа.

Практически все типы DC способны поглощать экзогенные вирусные антигены, которые высвобождаются из погибших гепатоцитов. Захваченные DC HCV-белки подвергаются расщеплению в эндосомах или лизосомах, связываются в везикулах с MHC-II и транспортируются на поверхность клетки. Анализ T-клеток памяти у реконвалесцентов после HCV-инфекции позволил выявить от 4 до 14 эпитопов $CD4^+$ T-лимфоцитов в составе Core-, NS3-, NS4- и NS5-белков. Также показано, что одним из доминантных белков, индуцирующих ответ $CD4^+$ T-клеток, является NS3 [81]. Характерно, что более низкая частота и выраженность HCV-специфического пролиферативного ответа $CD4^+$ T-клеток у больных ХГС в сравнении с реконвалесцентами ассоциирована со снижением количества DC в периферической крови и их стимуляторной активности [21].

Эндогенные, то есть синтезируемые в DC вирусные белки, процессируются в цитоплазме протеосомами, после чего комплексы пептид–MHC-I класса перемещаются на поверхность клетки и распознаются $CD8^+$ T-лимфоцитами. Способность HCV инфицировать DC очень низкая. Проникновение вируса в клетку осуществляется путем взаимодействия оболочечных белков E1 и E2 с лектиновыми рецепторами с-типа DC-SIGN и L-SIGN [58]. Однако в отсутствие выраженной вирусной репликации синтеза вирусных белков не происходит, что делает не-

эффективной прямую презентацию эндогенных вирусных белков CD8⁺ Т-клеткам инфицированными DC. Тем не менее презентация вирусных антигенов CD8⁺ Т лимфоцитам происходит, что подтверждается выявлением значительного количества примированных CD8⁺ Т-клеток у реконвалесцентов [51]. Данный процесс получил название кросс-презентации. В этом случае экзогенные вирусные белки презентуются CD8⁺ Т-клеткам в комплексе с МНС-I [37, 70]. Сборка молекул МНС-I происходит в эндоплазматическом ретикулуме, куда попадают прошедшие процессинг вирусные пептиды. Процессинг антигенов при кросс-презентации может происходить в цитозоле и вакуолях. В первом случае вирусные белки процессируются в протеосоме, после чего транспортируются в эндоплазматический ретикулум. Во втором случае антигены расщепляются и связываются с МНС-I в эндосомах [40].

Презентация вирусных белков и примирование CD8⁺ Т-клеток при HCV-инфекции характеризуется низкой эффективностью, поскольку вирус попадает в организм нелимфотропным путем; размножается в печени, не являющейся местом примирования; не реплицируется в DC; является нецитопатическим, что ограничивает поступление экзогенных кросс-презентируемых антигенов [37]. Соответственно, слабая антигенная презентация и примирование CD8⁺ Т-клеток способствуют хронизации HCV-инфекции.

Использование HCV вирусоподобных частиц (HCV-LPs) для изучения захвата, интернализации вируса и презентации антигенов *in vitro* показало, что способность к презентации вирусных пептидов свойственна преимущественно незрелым миелоидным DC. Взаимодействие HCV-LP с незрелыми mo-DC приводило к усилению экспрессии костимуляторных молекул и индукции сильного HCV-специфического ответа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [11]. Экзогенные вирусные белки могут захватываться всеми типами DC, однако наибольшей способностью к кросс-презентации обладают миелоидные DC [13]. Guo Z. с соавт. показали, что mo-DC, нагруженные HLA-A2-рестриктированными пептидами (в составе E2 и NS3-NS5 белков) индуцировали *in vitro* генерацию эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток у пациентов с HCV-инфекцией (реконвалесцентов и больных ХГС) [34]. Схожие данные были получены Mishra S. с соавт., которые синтезировали высококонсервативные HLA-A2-рестриктированные HCV эпитопы и HLA-DRB1-рестриктированные иммуногенные последовательности (ICS) и продемонстрировали способность DC при нагрузке указанными пептидами индуцировать специфический ответ наивных Т-клеток доноров, который проявлялся увеличением числа IFN γ -продуцирующих Т-клеток [60]. Первоначально наиболее высокая кросс-презентирующая ак-

тивность приписывалась CD11c⁺CD141⁺ mDC-2, являющимся гомологами мышинных CD8⁺ DC [6]. Тем не менее более поздние исследования показали, что кросс-презентация является общим свойством DC человека (mo-DC, а также mDC и pDC периферической крови). Более того, pDC также обладают способностью презентовать экзогенные антигены в комплексе с МНС-I [46, 64]. И все же вопрос о роли pDC в кросс-презентации HCV-белков остается открытым.

Характеристика DC при остром вирусном гепатите С

Поскольку заражение HCV протекает бессимптомно, и клинические проявления инфекции отмечаются лишь у небольшой части пациентов, [78], возможности исследования DC в этом периоде весьма ограничены [24]. Содержание mDC в крови пациентов с острым вирусным гепатитом С по данным разных авторов либо не изменено [67], либо снижено [66]. Сообщается также о нарушении дифференцировки и созревания mo-DC, что проявляется повышенной экспрессией CD14 и сниженной экспрессией CD1a, CD86 и CD83 на незрелых mo-DC и уменьшением экспрессии CD86 и HLA-DR на зрелых mo-DC [35]. При этом между количеством/функциями mDC и исходом заболевания выявляется взаимосвязь. Так, разрешение инфекции ассоциировано с возрастанием к 6-месячному периоду после инфицирования циркулирующих mDC, тогда как при хронизации инфекции этого не происходит [67]. Кроме того, mDC у пациентов с разрешением инфекции продуцируют более высокие уровни TNF α при стимуляции LPS [66]. Исследования pDC при остром вирусном гепатите С свидетельствуют об уменьшении их количества в периферической крови, а также о незрелом фенотипе, что проявляется низкой экспрессией HLA-DR и хемокинового рецептора CCR7. Кроме того, pDC отличаются сниженной продукцией IFN α [91]. Данные о взаимосвязи между содержанием pDC и исходом инфекции неоднозначны. Szabo G. с соавт. выявили выраженное снижение количества pDC и продукции ими IFN α как у пациентов с исходом в хронизацию, так и с выздоровлением [85]. Кроме того, гиперреактивность DC на стимуляцию ssRNA, свойственная исходно всем пациентам, была устойчивой только у пациентов с разрешением инфекции [66]. В целом данные об изменениях количества/функции DC у пациентов с острым гепатитом С и сопряженности этих нарушений с клиническими исходами свидетельствуют о вовлечении DC на самых ранних стадиях HCV-инфекции и их возможной роли в развитии адаптивного иммунного ответа, обеспечивающего элиминацию вируса.

Характеристика DC при хронической HCV-инфекции

Свойства DC у больных ХГС изучены гораздо лучше, чем при острой HCV-инфекции (табл. 2). Значительная часть этих исследований посвящена анализу mo-DC и популяциям DC периферической крови (mDC и pDC). В литературе встречаются единичные сообщения о сохранности функций циркулирующих DC при хронической HCV-инфекции [57], тем не менее большинство авторов считают, что DC пациентов ХГС отличаются от DC здоровых доноров [20, 75].

Несмотря на некоторые разночтения в отношении того, какой тип DC в циркуляции снижен — mDC, pDC или оба — большинство исследований демонстрирует снижение количества DC в периферической крови [21, 43, 62, 95]. Количество циркулирующих DC по данным ряда авторов зависит от активности гепатита. В частности, содержание mDC обратно коррелирует с уровнем АЛТ [49, 95], что может быть обусловлено компартиментализацией DC в печени у пациентов с высокой активностью гепатита. При этом важно подчеркнуть, что количество IL-12-продуцирующих DC прямо коррелирует с Th1-ответом [3, 21], а содержание pDC коррелирует с уровнем продукции IFN α [95].

Наряду с количественными изменениями, DC больных ХГС характеризуются функциональными нарушениями. Для mDC это проявляется задержкой созревания [21], сниженной продукцией IL-12 и TNF α и повышенной секрецией IL-10 [3, 21, 61]. Кроме того, mDC больных ХГС отличались более низкой аллостимуляторной активностью и способностью стимулировать Th1-ответ [43, 44, 62, 82], но при этом индуцировали пролиферацию регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-клеток и экспансию IL-10-секретирующих Т-клеток в алло-СКЛ [23].

Для pDC, противовирусная активность которых во многом связана с продукцией IFN α , показано снижение секреции IFN α циркулирующими pDC [21, 43, 49, 86, 95]. Однако по данным других авторов способность pDC больных ХГС синтезировать IFN α не нарушена [57, 69]. Циркулирующие pDC при ХГС характеризуются низкой аллостимуляторной активностью и способностью активировать Th1-ответ [43, 44, 62, 97]. Имеются данные о повышенной экспрессии этими клетками PD-1L [82], являющегося лигандом ингибиторной молекулы PD-1 на Т-лимфоцитах. Плазмацитоидные DC, так же как и mDC, способны активировать IL-10-секретирующие CD4⁺ Т-клетки [44].

Данные, характеризующие mo-DC у больных ХГС, более противоречивы. С одной стороны показано нарушение созревания mo-DC [32]; возрастание экспрессии на них PD-1L [23]; снижение продукции провоспалительных цитокинов и IFN α , и усиление секреции IL-10 [30, 32,

75]; снижение аллостимуляторной активности [7, 42, 86] и способности активировать Th1-ответ [68]; способность стимулировать пролиферацию регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-клеток и экспансию IL-10-секретирующих Т-клеток в алло-СКЛ [23]. При этом, несмотря на схожесть дефектов mo-DC и mDC периферической крови, mo-DC отличаются mDC менее эффективным ответом на факторы созревания, в частности, сохраняют частично незрелый фенотип после стимуляции LPS [5].

С другой стороны, многие авторы не обнаруживают этих изменений со стороны mo-DC. Piccioli D. с соавт. показали, что незрелые mo-DC обладают сохранной аллостимуляторной активностью, а также способностью к созреванию и продукции TNF α в ответ на стимуляцию LPS [69]. Схожие результаты, свидетельствующие о сохранной способности mo-DC стимулировать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в алло-СКЛ получены Fan Z. с соавт. [30]. Barnes E с соавт. не выявили различий mo-DC больных ХГС и здоровых доноров в экспрессии поверхностных маркеров, продукции IL-10 и IL-12p70, аллостимуляторной активности и способности зрелых mo-DC индуцировать экспансию антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток [9]. Сохранный фенотип зрелых mo-DC и способность стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов, а также индуцировать специфические к антигенам вируса гепатита Т-клетки памяти показаны в исследовании Longman R.S. с соавт. [56]. Аналогичные данные получены Canaday D.H. с соавт., которые продемонстрировали сохранную антигенпрезентирующую функцию mo-DC у пациентов с хронической HCV-инфекцией [16]. Возможно, одной из причин имеющихся расхождений является предлеченность пациентов рибаверином и интерфероном-альфа, которые характеризуются иммуномодулирующим эффектом и могут влиять на функции DC [10].

Механизмы нарушений функциональной активности DC

Функции DC во многом определяются балансом костимуляторных и коингибиторных молекул и спектром продуцируемых цитокинов, что во многом ассоциировано со зрелостью DC. Повышенная экспрессия на DC антигенпрезентирующих и костимуляторных молекул (HLA-DR, CD80, CD86, CD40, OX40L) и секреция провоспалительных цитокинов (IL-12, TNF α) способствует Т-клеточной активации, тогда как экспрессия коингибиторных молекул (PD-L1, CTLA-4, IDO) и синтез супрессорных цитокинов (IL-10) индуцирует Т-клеточную толерантность [8, 65].

Механизмы нарушений DC при HCV-инфекции окончательно не выяснены. Тем не менее, многие дефекты связывают с ингибирующим

Таблица 2. Характеристика DC при хронической HCV-инфекции

Table 2. DC characteristics in chronic HCV infection

Типы DC и их характеристики DC types and their characteristics	Ссылки References	Типы DC и их характеристики DC types and their characteristics	Ссылки References
Миелоидные DC (mDC) Myeloid DCs (mDCs)		Плазмацитоидные DC (pDC) Plasmacytoid DCs (pDCs)	
Количество не изменено Cell number unchanged	[57]	↓ аллостимуляторная активность ↓ allostimulatory activity	[43, 62, 75, 82]
Количество снижено Cell number reduced	[21, 43, 62, 95]	↓ Th1-стимулирующая активность ↓ Th1-stimulatory activity	[43, 97]
Нарушение созревания Impaired maturation	[21]	↑ экспрессия PD-1L ↑ PD-1L expression	[82]
↓ продукция IL-12 и/или TNFα ↓ IL-12 and/or TNFα production	[3, 21, 43, 61]	↑ индукция IL-10-секретирующих T-клеток ↑ induction of IL-10-producing T cells	[43, 44]
↓ аллостимуляторная активность ↓ allostimulatory activity	[43, 62, 82]	Количество pDC прямо коррелирует с продукцией IFNα The number of pDCs is directly correlated with IFNα production	[95]
↓ Th1-стимулирующая активность ↓ Th1-stimulatory activity	[43, 44, 62]	DC, генерированные из моноцитов крови (mo-DC) Monocyte-derived DCs (mo-DCS)	
↑ экспрессия PD-1L ↑ PD-1L expression	[82]	Созревание не нарушено Maturation is not impaired	[57, 69]
↑ продукция IL-10 ↑ IL-10 production	[21]	Нарушение созревания Impaired maturation	[32]
↑ индукция IL-10-секретирующих T-клеток ↑ induction of IL-10-producing T cells	[23, 43, 44]	Продукция цитокинов не нарушена Cytokines production is not impaired	[9, 69]
↑ стимуляция пролиферации CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-клеток ↑ stimulation of CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T cells proliferation	[23]	↓ продукция IL-12 и/или провоспалительных цитокинов ↓ production of IL-12 and/or pro-inflammatory cytokines	[30, 3]
Количество mDC обратно коррелирует с АЛТ The number of mDCs is inversely correlated with ALT	[49, 95]	↓ продукция IFNα при стимуляции poly(I:C) ↓ production of IFNα upon stimulation with poly(I:C)	[75]
Продукция IL-12 mDC прямо коррелирует с количеством HCV-специфических T-клеток IL-12 production by mDCs directly correlates with the number of HCV-specific T cells	[3]	Аллостимуляторная активность не нарушена Allostimulatory activity is not impaired	[30, 57, 69]
Th1-ответ прямо и обратно коррелирует с количеством IL-12⁺ и IL-10⁺ mDC соответственно Th1 response directly and inversely correlated with the number of IL-12 ⁺ and IL-10 ⁺ mDCs respectively	[21]	↓ аллостимуляторная активность ↓ allostimulatory activity	[7, 42, 86]
Плазмацитоидные DC (pDC) Plasmacytoid DCs (pDCs)		Стимуляция антигенспецифических T-клеток не нарушена Stimulation of antigen-specific T cells is not impaired	[9, 56]
Количество не изменено Cell number unchanged	[57]	↓ Th1-стимулирующая активность ↓ Th1-stimulatory activity	[23, 68]
Количество снижено Cell number reduced	[21, 43, 62, 86, 95]	↑ продукция IL-10 ↑ IL-10 production	[32]
Продукция IFNα не изменена IFNα production unchanged	[57, 69]	↑ индукция IL-10-секретирующих T-клеток ↑ induction of IL-10-producing T cells	[23]
↓ продукция IFNα ↓ IFNα production	[3, 43, 62, 86]	↑ стимуляция пролиферации CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-клеток ↑ stimulation of CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T cells proliferation	[23]

Примечание: здесь и в таблице 3 ↑ — увеличение; ↓ — снижение.
Note: here and in table 3 ↑ — increase; ↓ — decrease.

действием HCV-белков. Показано, что структурные и неструктурные HCV-белки (Core, NS3, NS4, NS5) при добавлении в культуры mo-DC (или их трансфекции) ингибируют дифференцировку и индуцируют экспрессию PD-1L, подавляют продукцию IL-12 и усиливают секрецию IL-10, угнетают аллостимуляторную активность DC и их способность активировать Th1-ответ [14, 22, 79, 90, 94]. Присутствие HCV (генотип 1a, клон H77 или 2a, клон JFH1) в культурах mo-DC также вызывает нарушение созревания, усиление продукции IL-10, и подавление способности стимулировать антигенспецифический ответ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Причем в этом случае нарушение функции DC не связано с репликацией вируса и экспрессией DC вирусных белков [77].

Влияние HCV белков на функциональную активность DC опосредуется вовлечением различных механизмов (табл. 3), включая нарушение экспрессии костимуляторных и антигенпрезентирующих молекул, блокирование TLR-сигнальных путей и ядерной транслокации NF-κB, подавление продукции IL-12, а также активация коингибиторных факторов (PD-1L, IL-10, IDO) [48, 76]. Так, взаимодействие HCV Core с gC1q-рецептором на mo-DC активирует фосфатидилинозитол-3-киназный (PI3K) путь, что приводит к снижению TLR4-индуцированной продукции IL-12 и, соответственно, подавлению Th1-стимулирующей активности DC [94]. Кроме того, экзогенный HCV Core-белок активирует транскрипционный фактор STAT3, который является ингибитором воспалительного ответа DC. Core-индуцированная активация STAT3 осуществляется с вовлечением PI3K/Акт сигнального пути, аутокринной продукции IL-6 и подавляет активацию DC, что в свою очередь обуславливает нарушение противовирусного Т-клеточного ответа [87]. При этом усиление продукции IL-6 может являться причиной акти-

вации Th17-клеток [90]. Активация STAT3, помимо нарушения дифференцировки DC, может приводить к генерации миелоидных супрессорных клеток, также ингибирующих Т-клеточный ответ [18].

NS3/4A HCV-белки, обладая протеазной активностью, способны расщеплять адапторные молекулы TRIF и IPS-1 и ингибировать проведение сигнала, соответственно, через TLR-3 и RIG-I рецепторы, что приводит к угнетению продукции провоспалительных цитокинов (IL-12 и TNFα). Взаимодействие таких DC с Т-лимфоцитами вызывает нарушение функций HCV-специфических CD8⁺ Т-клеток в виде снижения продукции IFNγ, IL-2, TNFα и экспрессии дегрануляционного маркера CD107a, обуславливая развитие феномена Т-клеточного истощения [73].

Подавление функций DC под действием вирусных белков обусловлено снижением костимуляторных молекул и активацией генов, причастных к толерогенному фенотипу DC. Так, Core и NS5 на этапе LPS-индуцированного созревания mo-DC ингибируют экспрессию HLA-DR, CD83, CD80 и CD86, но при этом усиливают экспрессию PD-L1 и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) [71, 92]. PD-L1 является коингибиторной молекулой, которая, взаимодействуя с PD-1 рецептором на Т-клетках, вызывает апоптоз/анергию Т-лимфоцитов [31]. Действительно, экспрессия PD-L1 и соотношение PD-L1/CD86 на DC больших ХГС обратно коррелирует с их аллостимуляторной активностью [82]. Толерогенные свойства mDC при ХГС могут быть также связаны с повышенной экспрессией IDO, метаболизирующей триптофан. Дефицит триптофана и появление его токсичных метаболитов приводит к подавлению пролиферации Т-клеток и повышает их чувствительность к апоптозу [29]. Повышенная экспрессия моноцитами и mo-DC

Таблица 3. Механизмы функциональных нарушений DC при HCV-инфекции

Table 3. Mechanisms of DC functional defects in HCV infection

Механизмы Mechanisms	Дисфункции DC DC functional defects	Ссылки References
Активация PI3K PI3K activation	↓ IL-12 и Th1-стимулирующей активности ↓ IL-12 and Th1-stimulatory activity	[87, 94]
↓ ядерной транслокации NF-κB ↓ NF-κB nuclear translocation	Нарушение функций DC Impaired of DCs functions	[48]
Нарушение TRIF и IPS-1 сигнальных путей Disturbance of TRIF and IPS-1 signaling pathways	↓ IL-12 и TNFα; индукция состояния истощения CD8 Т-клеток ↓ IL-12 and TNFα; induction of CD8 T-cell depletion state	[73]
↓ костимуляторных молекул ↓ co-stimulatory molecules	↓ аллостимуляторной активности ↓ allostimulatory activity	[48, 71]
↑ PD-L1 ↑ PD-L1	Индукция Т-клеточного истощения Induction of T-cell depletion state	[82, 92]
↑ IDO ↑ IDO	Индукция толерогенного фенотипа Induction of tolerogenic phenotype	[80]
↑ SOCS3 ↑ SOCS3	Нарушение созревания и индукция толерогенного фенотипа Impaired maturation and induction of tolerogenic phenotype	[55, 71]

IDO характерна для пациентов с ХГС и ассоциируется с повышенным индексом соотношения кинуренина/триптофана в сыворотке крови и нарушенным созреванием мо-DC *in vitro*. При этом блокирование активности IDO 1-метилтриптофаном восстанавливает способность мо-DC к созреванию [80]. Кроме того, взаимодействие вирусных белков с DC активирует белок SOCS3 [71]. Данный белок блокирует цитокин-индуцированный JAK-STAT-сигнальный путь [47], что приводит к нарушению созревания DC и индукции толерогенного фенотипа [55].

Терапевтический потенциал DC вакцин в лечении HCV-инфекции

Сниженная способность Т-клеток отвечать на стимуляцию антигенами HCV, свидетельствующая о нарушении адаптивного иммунного ответа, рассматривается в качестве одного из ведущих факторов хронизации HCV-инфекции. Поскольку запуск антигенспецифического Т-клеточного ответа непосредственно зависит от DC, снижение их количества в циркуляции и нарушение функций в результате воздействия вируса/или вирусных белков, а также иммуносупрессивное микроокружение печени, может являться важной причиной несостоятельности иммунного ответа и персистенции вируса. Соответственно, использование DC, нагруженных вирусными антигенами, для индукции или усиления адаптивного противовирусного иммунитета обсуждается в качестве новой стратегии в комплексном лечении хронической HCV-инфекции. В этом случае в качестве источника DC предлагается использовать DC, генерируемые из моноцитов, которые очень схожи с mDC периферической крови.

Способность мо-DC здоровых доноров индуцировать *in vitro* HCV-специфический Т-клеточный ответ была впервые продемонстрирована Li W. с соавт., которые использовали DC трансфицированные HCV Core- и NS3-генами [54]. На выборке трех репрезентативных доноров было показано, что незрелые Core- и NS3-экспрессирующие DC активировали в Т-клетках экспрессию мРНК TNF α , IL-2 и IL-4, а зрелые DC — экспрессию IFN γ , TNF α , IL-12-p40, IL-6, IL-10 и, в меньшей степени, IL-4. Авторы также продемонстрировали индукцию антигенспецифического пролиферативного ответа, который выявлялся у всех трех доноров и был выше при стимуляции Core, а также усиление продукции IFN γ , выявленное у двух доноров [53].

Мо-DC больных ХГС также были способны индуцировать *in vitro* HCV-специфический ответ. Так, Echeverria I. с соавт. в группе 4 репрезентативных пациентов показали, что мо-DC, трансфицированные NS3 и адаптерной молекулой CFh40L (эктодомен CD40L) сти-

мулируют NS3-специфический ответ аутологичных Т-клеток, оцениваемый по количеству IFN γ -продуцирующих клеток в ELISPOT-тесте. Однако в отсутствие адаптерной молекулы DC пациентов не оказывали стимулирующего эффекта, что, по мнению авторов, было обусловлено снижением стимуляторной активности DC у больных ХГС и ее восстановлением после трансфекции CFh40L. Чтобы исключить неспецифический ответ на антигены трансфицированного аденовируса, авторы также оценили продукцию IFN γ в ответ на стимуляцию пептидами NS3-белка во вторичных культурах Т-клеток, подверженных экспансии с помощью IL-2, и продемонстрировали возрастание IFN γ у двух из четырех пациентов [28].

Более поздние исследования подтвердили способность мо-DC, нагруженных иммуногенными пептидами HCV, активировать Th1-ответ и индуцировать генерацию эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток [34, 60].

Возможность использования DC в качестве терапевтических вакцин была также проанализирована в двух клинических исследованиях [33, 99]. В первом Gowans E.J. с соавт. оценили безопасность и эффективность аутологичных DC, нагруженных HLA-A2.1 рестриктированными HCV-специфическими липопептидами (эпитопы цитотоксических Т-клеток, связанные с липидным фрагментом), у 6 больных ХГС [33]. Во втором Zabaleta A. с соавт. исследовали безопасность и эффективность вакцины на основе мо-DC, трансфицированных аденовирусом, кодирующим NS3 (AdNS3) и адаптерную молекулу CFh40L [99]. В обоих исследованиях вакцинация DC не вызывала тяжелых нежелательных явлений и возрастания в сыворотке крови трансаминаз, отражающих активность воспалительного процесса. Однако индуцированный иммунный ответ был переходящим и недостаточно выраженным для подавления вирусной репликации. В исследованиях Gowans E.J. с соавт. значимое возрастание Core-специфических IFN γ -секретирующих клеток (в ELISPOT-тесте) выявлялось у 4 из 6 пациентов, а возрастание NS3-специфических IFN γ секретирующих клеток — только у одного, но эти ответы были переходящими [33]. Аналогичным образом вакцинация с использованием мо-DC, нагруженных AdNS3/CFh40L, приводила к увеличению числа IFN γ -секретирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию рекомбинантным NS3 только у одного из 5 пациентов. Ответ цитотоксических Т-клеток в виде прироста CD8⁺CD107a⁺ Т-лимфоцитов наблюдался у всех пациентов, но был недостаточно выраженным и неустойчивым [99]. Причинами слабого иммунного ответа в первом исследовании могли быть внутривенный путь введения DC, недостаточное (для запуска мультиспецифического ответа) количество используемых Т-клеточных эпитопов, а также

низкие дозы DC. Во втором исследовании авторы связали неэффективность индукции иммунного ответа с повышенной продукцией DC IL-10 в результате трансфекции AdNS3, что приводило к активации IL-10-продуцирующих Т-клеток. Очевидно, что создание терапевтических анти-HCV DC-вакцин требует дальнейших исследований с определением оптимальных параметров в отношении доз DC, источников антигенов для нагрузки DC, путей введения DC и адьювантной терапии.

Заключение

За последнее десятилетие активное изучение иммунных механизмов, участвующих в элиминации вируса гепатита С, привело к пониманию роли адаптивного иммунного ответа при ХГС. Дисфункция DC рассматривается как одна из возможных причин неэффективного анти-HCV-специфического Т-клеточного ответа. HCV-инфекция приводит к разнообразным нарушениям миелоидных и плазматоидных DC, что проявляется снижением их количе-

ства в циркуляции, уменьшением экспрессии антигенпрезентирующих и костимуляторных молекул, низкой аллостимуляторной активностью и изменением баланса продуцируемых цитокинов со смещением в сторону доминирования противовоспалительных и иммуносупрессивных цитокинов, способных индуцировать регуляторные Т-клетки. Нарушения со стороны DC проявляются уже на стадии острой инфекции и нивелируются у пациентов с исходом в выздоровление, однако сохраняются у пациентов с персистенцией инфекции. Генерация *ex vivo* DC позволяет получить их в достаточно больших количествах и при необходимости корректировать функциональные дефекты. Вакцинация пациентов такими DC рассматривается в качестве перспективной стратегии лечения ХГС. Данный подход, направленный на индукцию эффективного Т-клеточного ответа, вероятно, будет наиболее успешным в комплексе с противовирусной терапией, учитывая возможность развития иммунологической памяти после элиминации вируса.

Список литературы/References

1. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 4, pp. 783–801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
2. Andronescu D., Diaconu S., Tiuca N., Purcarea R.M., Andronescu C.I. Hepatitis C treatment and management. *J. Med. Life*, 2014, vol. 7, no. 1, pp. 31–36.
3. Anthony D.D., Yonkers N.L., Post A.B., Asaad R., Heinzl F.P., Lederman M.M., Lehmann P.V., Valdez H. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, no. 8, pp. 4907–4916. doi: 10.4049/jimmunol.172.8.4907
4. Antonelli A., Ferri C., Galeazzi M., Giannitti C., Manno D., Mieli-Vergani G., Menegatti E., Olivieri I., Puoti M., Palazzi C., Roccatello D., Vergani D., Sarzi-Puttini P., Atzeni F. HCV infection: pathogenesis, clinical manifestations and therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2008, vol. 26 (1 Suppl. 48): S39–47.
5. Auffermann-Gretzinger S., Keffe E.B., Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*, 2001, vol. 97, no. 10, pp. 3171–3176. doi: 10.1182/blood.V97.10.3171
6. Bachem A., Guttler S., Hartung E., Ebstein F., Schaefer M., Tannert A., Salama A., Movassaghi K., Opitz C., Mages H.W., Henn V., Kloetzel P.M., Gurka S., Kroczeck R.A. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2010, vol. 207, no. 6, pp. 1273–1281. doi: 10.1084/jem.20100348
7. Bain C., Fatmi A., Zoulim F., Zarski J.P., Trepo C., Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*, 2001, vol. 120, no. 2, pp. 512–524. doi: 10.1053/gast.2001.21212
8. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.*, 2000, vol. 18, pp. 767–811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767
9. Barnes E., Salio M., Cerundolo V., Francesco L., Pardoll D., Klenerman P., Cox A. Monocyte derived dendritic cells retain their functional capacity in patients following infection with hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.*, 2008, vol. 15, no. 3, pp. 219–228. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00934.x
10. Barnes E., Salio M., Cerundolo V., Medlin J., Murphy S., Dusheiko G., Klenerman P. Impact of interferon- α and ribavirin on the function of maturing dendritic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, no. 9, pp. 3382–3389. doi: 10.1128/AAC.48.9.3382-3389.2004
11. Barth H., Ulsenheimer A., Pape G.R., Diepolder H.M., Hoffmann M., Neumann-Haefelin C., Thimme R., Henneke P., Klein R., Paranhos-Baccala G., Depla E., Liang T.J., Blum H.E., Baumert T.F. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 9, pp. 3605–3614. doi: 10.1182/blood-2004-05-1952
12. Bode J.G., Brenndorfer E.D., Haussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem.*, 2008, vol. 389, no. 10, pp. 1283–1298. doi: 10.1515/BC.2008.147
13. Boltjes A., van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol.*, 2014, vol. 5: 131. doi: 10.3389/fimmu.2014.00131
14. Brady M.T., MacDonald A.J., Rowan A.G., Mills K.H. Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2003, vol. 33, no. 12, pp. 3448–3457. doi: 10.1002/eji.200324251
15. Burke K.P., Cox A.L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. *Immunol. Res.*, 2010, vol. 47, no. 1–3, pp. 216–227. doi: 10.1007/s12026-009-8152-3

16. Canaday D.H., Burant C.J., Jones L., Aung H., Woc-Colburn L., Anthony D.D. Preserved MHC-II antigen processing and presentation function in chronic HCV infection. *Cell Immunol.*, 2011, vol. 266, no. 2, pp. 187–191. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.10.003
17. Cheent K., Khakoo S.I. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut*, 2011, vol. 60, no. 2, pp. 268–278. doi: 10.1136/gut.2010.212555
18. Cheng P., Corzo C.A., Luetetteke N., Yu B., Nagaraj S., Bui M.M., Ortiz M., Nacken W., Sorg C., Vogl T. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J. Exp. Med.*, 2008, vol. 205, no. 10, pp. 2235–2249. doi: 10.1084/jem.20080132
19. Collin M., McGovern N., Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013, vol. 140, no. 1, pp. 22–30. doi: 10.1111/imm.12117
20. Crosignani A., Riva A., Della Bella S. Analysis of peripheral blood dendritic cells as a non-invasive tool in the follow-up of patients with chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.*, 2016, vol. 22, no. 4, pp. 1393–1404. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1393
21. Della Bella S., Crosignani A., Riva A., Presicce P., Benetti A., Longhi R., Podda M., Villa M.L. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology*, 2007, vol. 121, no. 2, pp. 283–292. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02577.x
22. Dolganiuc A., Kodys K., Kopasz A., Marshall C., Do T., Romics L. Jr., Mandrekar P., Zapp M., Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 11, pp. 5615–5624. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5615
23. Dolganiuc A., Paek E., Kodys K., Thomas J., Szabo G. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology*, 2008, vol. 135, no. 6, pp. 2119–2127. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.082
24. Dolganiuc A., Szabo G. Dendritic cells in hepatitis C infection: can they (help) win the battle? *J. Gastroenterol.*, 2011, vol. 46, no. 4, pp. 432–447. doi: 10.1007/s00535-011-0377-y
25. Dustin L.B., Bartolini B., Capobianchi M.R., Pistello M. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, vol. 22, no. 10, pp. 826–832. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.025
26. Dustin L.B., Cashman S.B., Laidlaw S.M. Immune control and failure in HCV infection — tipping the balance. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, vol. 96, no. 4, pp. 535–548. doi: 10.1189/jlb.4RI0214-126R
27. Dustin L.B., Rice C.M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 25, pp. 71–99. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141602
28. Echeverria I., Pereboev A., Silva L., Zabaleta A., Riezu-Boj J.I., Bes M., Cubero M., Borrás-Cuesta F., Lasarte J.J., Esteban J.I., Prieto J., Sarobe P. Enhanced T cell responses against hepatitis C virus by *ex vivo* targeting of adenoviral particles to dendritic cells. *Hepatology*, 2011, vol. 54, no. 1, pp. 28–37. doi: 10.1002/hep.24325
29. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.*, 2002, vol. 9, no. 10, pp. 1069–1077. doi: 10.1038/sj.cdd.4401073
30. Fan Z., Huang X.L., Kalinski P., Young S., Rinaldo C.R. Jr. Dendritic cell function during chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2007, vol. 14, no. 9, pp. 1127–1137. doi: 10.1128/CVI.00141-07
31. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L.J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M.C., Horton H.F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M.R., Carreno B.M., Collins M., Wood C.R., Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, no. 7, pp. 1027–1034. doi: 10.1084/jem.192.7.1027
32. Gelderblom H.C., Nijhuis L.E., de Jong E.C., te Velde A.A., Packrat D., Reesink H.W., Beld M.G., van Deventer S.J., Jansen P.L. Monocyte-derived dendritic cells from chronic HCV patients are not infected but show an immature phenotype and aberrant cytokine profile. *Liver Int.*, 2007, vol. 27, no. 7, pp. 944–953. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01507.x
33. Gowans E.J., Roberts S., Jones K., Dinatale I., Latour P.A., Chua B., Eriksson E.M., Chin R., Li S., Wall D.M., Sparrow R.L., Moloney J., Loudovaris M., Ffrench R., Prince H.M., Hart D., Zeng W., Torresi J., Brown L.E., Jackson D.C. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *J. Hepatol.*, 2010, vol. 53, no. 4, pp. 599–607. doi: 10.1016/j.jhep.2010.05.007
34. Guo Z., Zhang H., Rao H., Jiang D., Cong X., Feng B., Wang J., Wei L., Chen H. DCs pulsed with novel HLA-A2-restricted CTL epitopes against hepatitis C virus induced a broadly reactive anti-HCV-specific T lymphocyte response. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6: e38390. doi: 10.1371/journal.pone.0038390
35. Hancharou A.Y., Titov L.P., DuBuske L.M. Altered phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in acute hepatitis C and chronic hepatitis C. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, vol. 123, no. 2, S221. doi: 10.1016/j.jaci.2008.12.846
36. Hiet M.S., Bauhofer O., Zayas M., Roth H., Tanaka Y., Schirmacher P., Willemsen J., Grünvogel O., Bender S., Binder M., Lohmann V., Lotteau V., Ruggieri A., Bartenschlager R. Control of temporal activation of hepatitis C virus-induced interferon response by domain 2 of nonstructural protein 5A. *J. Hepatol.*, 2015, vol. 63, no. 4, pp. 829–837. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.015
37. Holz L., Rehmann B. T cell responses in hepatitis C virus infection: historical overview and goals for future research. *Antiviral Res.*, 2015, vol. 114, pp. 96–105. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.11.009
38. Imran M., Waheed Y., Manzoor S., Bilal M., Ashraf W., Ali M., Ashraf M. Interaction of hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors. *Virology*, 2012, vol. 9: 126. doi: 10.1186/1743-422X-9-126
39. Jinushi M., Takehara T., Kanto T., Tatsumi T., Groh V., Spies T., Miyagi T., Suzuki T., Sasaki Y., Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 3, pp. 1249–1256. doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1249
40. Joffre O.P., Segura E., Savina A., Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, no. 8, pp. 557–569. doi: 10.1038/nri3254
41. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y.J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 194, no. 6, pp. 863–869. doi: 10.1084/jem.194.6.863

42. Kanto T., Hayashi N., Takehara T., Tatsumi T., Kuzushita N., Ito A., Sasaki Y., Kasahara A., Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, no. 9, pp. 5584–5591.
43. Kanto T., Inoue M., Miyatake H., Sato A., Sakakibara M., Yakushijin T., Oki C., Itose I., Hiramatsu N., Takehara T. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 190, no. 11, pp. 1919–1926. doi: 10.1086/425425
44. Kanto T., Inoue M., Miyazaki M., Itose I., Miyatake H., Sakakibara M., Yakushijin T., Kaimori A., Oki C., Hiramatsu N., Kasahara A., Hayashi N. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology*, 2006, vol. 49, no. 1–2, pp. 58–63. doi: 10.1159/000087264
45. Kaplan D.E. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 2015, vol. 44, no. 4, pp. 735–760. doi: 10.1016/j.gtc.2015.07.004
46. Klechevsky E., Flamar A.L., Cao Y., Blanck J.P., Liu M., O'Bar A., Agouna-Deciat O., Klucar P., Thompson-Snipes L., Zurawski S., Reiter Y., Palucka A.K., Zurawski G., Banchereau J. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood*, 2011, vol. 116, no. 10, pp. 1685–1697. doi: 10.1182/blood-2010-01-264960
47. Krebs D.L., Hilton D.J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 2001, vol. 19, no. 5, pp. 378–387. doi: 10.1634/stemcells.19-5-378
48. Krishnadas D.K., Ahn J.S., Han J., Kumar R., Agrawal B. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. *Int. Immunol.*, 2010, vol. 22, no. 6, pp. 491–502. doi: 10.1093/intimm/dxq033
49. Kunitani H., Shimizu Y., Murata H., Higuchi K., Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J. Hepatol.*, 2002, vol. 36, no. 6, pp. 734–741. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00062-4
50. Landi A., Babiuk L.A., van Drunen Litte, van den Hurk S. Dendritic cells matured by a prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- α or LPS. *Immunobiology*, 2011, vol. 216, no. 6, pp. 649–662. doi: 10.1016/j.imbio.2010.11.004
51. Lechner F., Wong D.K., Dunbar P.R., Chapman R., Chung R.T., Dohrenwend P., Robbins G., Phillips R., Klenerman P., Walker B.D. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, no. 9, pp. 1499–1512. doi: 10.1084/jem.191.9.1499
52. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.*, 2014, vol. 426, no. 6, pp. 1246–1264. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.024
53. Li W., Krishnadas D.K., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Induction of primary human T cell responses against hepatitis C virus-derived antigens NS3 or core by autologous dendritic cells expressing hepatitis C virus antigens: potential for vaccine and immunotherapy. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176, no. 10, pp. 6065–6075. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6065
54. Li W., Li J., Tyrrell D.L.J., Agrawal B. Expression of hepatitis C virus (HCV) derived Core or NS3 antigens in human dendritic cells leads to induction in pro-inflammatory cytokines and normal T cell stimulation capabilities. *J. Gen. Virol.*, 2006, vol. 87, pp. 61–72. doi: 10.1099/vir.0.81364-0
55. Li Y., Chu N., Rostami A., Zhang G.X. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 3, pp. 1679–1688. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1679
56. Longman R.S., Talal A.H., Jacobson I.M., Albert M.L., Rice C.M. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood*, 2004, vol. 103, no. 3, pp. 1026–1029. doi: 10.1182/blood-2003-04-1339
57. Longman R.S., Talal A.H., Jacobson I.M., Rice C.M., Albert M.L. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 192, no. 3, pp. 497–503. doi: 10.1086/431523
58. Ludwig I.S., Lekkerkerker A.N., Depla E., Bosman F., Musters R.J.P., Depraetere S., van Kooyk Y., Geijtenbeek T.B.H. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 15, pp. 8322–8332. doi: 10.1128/JVI.78.15.8322-8332.2004
59. Manns M.P., Buti M., Gane E., Pawlotsky J.M., Razavi H., Terrault N., Younossi Z. Hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 2017, vol. 3: 17006. doi: 10.1038/nrdp.2017.6
60. Mishra S., Losikoff P.T., Self A.A., Terry F., Ardito M.T., Tassone R., Martin W.D., De Groot A.S., Gregory S.H. Peptide-pulsed dendritic cells induce the hepatitis C viral epitope-specific responses of naïve human T cells. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 26, pp. 3285–3292. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.083
61. Miyazaki M., Kanto T., Inoue M., Itose I., Miyatake H., Sakakibara M., Yakushijin T., Kakita N., Hiramatsu N., Takehara T., Kasahara A., Hayashi N. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. *J. Med. Virol.*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 980–988. doi: 10.1002/jmv.21174
62. Murakami H., Akbar S.M., Matsui H., Horiike N., Onji M. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 559–565. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02550.x
63. Neumann-Haefelin C., Thimme R. Success and failure of virus-specific T cell responses in hepatitis C virus infection. *Dig. Dis.*, 2011, vol. 29, no. 4, pp. 416–422. doi: 10.1159/000329807
64. Nierkens S., Tel J., Janssen E., Adema G.J. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol.*, 2013, vol. 34, no. 8, pp. 361–370. doi: 10.1016/j.it.2013.02.007
65. Obregon C., Kumar R., Pascual M.A., Vassalli G., Golshayan D. Update on dendritic cell-induced immunological and clinical tolerance. *Front Immunol.*, 2017, vol. 8: 1514. doi: 10.3389/fimmu.2017.01514
66. Pelletier S., Bédard N., Said E., Ancuta P., Bruneau J., Shoukry N.H. Sustained hyperresponsiveness of dendritic cells is associated with spontaneous resolution of acute hepatitis C. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 12, pp. 6769–6781. doi: 10.1128/JVI.02445-12
67. Perrella A., Atripaldi L., Bellopede P., Patarino T., Sbriglia C., Tarantino G., Sorrentino P., Conca P., Ruggiero L., Perrella O. Flow cytometry assay of myeloid dendritic cells (mDCs) in peripheral blood during acute hepatitis C: possible pathogenetic mechanisms. *World J. Gastroenterol.*, 2006, vol. 12, no. 7, pp. 1105–1109. doi: 10.3748/wjg.v12.i7.1105

68. Perrin-Cocon L., Agaugué S., Diaz O., Vanbervliet B., Dollet S., Guironnet-Paquet A., André P., Lotteau V. Th1 disabled function in response to TLR4 stimulation of monocyte-derived DC from patients chronically-infected by hepatitis C virus. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 5: e2260. doi: 10.1371/journal.pone.0002260
69. Piccioli D., Tavarini S., Nuti S., Colombatto P., Brunetto M., Bonino F., Ciccorossi P., Zorat F., Pozzato G., Comar C. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J. Hepatol.*, 2005, vol. 42, no. 1, pp. 61–67. doi: 10.1016/j.jhep.2004.09.014
70. Racanelli V., Manigold T. Presentation of HCV antigens to naive CD8+ T cells: why the where, when, what and how are important for virus control and infection outcome. *Clin. Immunol.*, 2007, vol. 124, no. 1, pp. 5–12. doi: 10.1016/j.clim.2007.04.009
71. Rana D., Chawla Y.K., Duseja A., Dhiman R.K., Arora S.K. Viral proteins mediate upregulation of negative regulatory factors causing down-modulated dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *EMJ Hepatology*, 2013, vol. 1, pp. 68–76.
72. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, vol. 6, no. 6, pp. 476–483. doi: 10.1038/nri1845
73. Rodrigue-Gervais I.G., Rigsby H., Jouan L., Sauvé D., Sékaly R.P., Willems B., Lamarre D. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8+ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, no. 6, pp. 3134–3144. doi: 10.4049/jimmunol.0902522
74. Roohvand F., Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2012, vol. 22, no. 4, pp. 391–415. doi: 10.1517/13543776.2012.673589
75. Ryan E.J., O'Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J. Viral Hepat.*, 2011, vol. 18, no. 9, pp. 601–607. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01453.x
76. Saha B., Szabo G. Innate immune cell networking in hepatitis C virus infection. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, vol. 96, no. 5, pp. 757–766. doi: 10.1189/jlb.4MR0314-141R
77. Saito K., Ait-Goughoulte M., Truscott S.M., Meyer K., Blazevic A., Abate G., Ray R.B., Hoft D.F., Ray R. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 7, pp. 3320–3328. doi: 10.1128/JVI.02547-07
78. Santantonio T., Wiegand J., Gerlach J.T. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J. Hepatol.*, 2008, vol. 49, no. 4, pp. 625–633. doi: 10.1016/j.jhep.2008.07.005
79. Sarobe P., Lasarte J.J., Casares N., López-Díaz de Cerio A., Baixeras E., Labarga P., García N., Borrás-Cuesta F., Prieto J. Abnormal priming of CD4+ T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 10, pp. 5062–5070. doi: 10.1128/JVI.76.10.5062-5070.2002
80. Schulz S., Landi A., Garg R., Wilson J.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. Indolamine 2,3-dioxygenase expression by monocytes and dendritic cell populations in hepatitis C patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, vol. 180, no. 3, pp. 484–498. doi: 10.1111/cei.12586
81. Semmo N., Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, no. 36, pp. 4831–4838. doi: 10.3748/wjg.v13.i36.4831
82. Shen T., Chen X., Chen Y., Xu Q., Lu F., Liu S. Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection. *J. Med. Virol.*, 2010, vol. 82, no. 7, pp. 1152–1159. doi: 10.1002/jmv.21809
83. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T., Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 318–327. doi: 10.1002/hep.26744
84. Stone A.E., Giugliano S., Schnell G., Cheng L., Leahy K.F., Golden-Mason L., Gale M. Jr., Rosen H.R. Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 4: e1003316. doi: 10.1371/journal.ppat.1003316
85. Szabo G., Dolganiuc A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. *Clin. Liver Dis.*, 2008, vol. 12, no. 3, pp. 675–692. doi: 10.1016/j.cld.2008.03.003
86. Szabo G., Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology*, 2005, vol. 210, no. 2–4, pp. 237–247. doi: 10.1016/j.imbio.2005.05.018
87. Tacke R.S., Tosello-Tramont A., Nguyen V., Mullins D.W., Hahn Y.S. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 12, pp. 10847–10855. doi: 10.1074/jbc.M110.217653
88. Takahashi K., Asabe S., Wieland S., Garaigorta U., Gastaminza P., Isogawa M., Chisari F.V. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 16, pp. 7431–7436. doi: 10.1073/pnas.1002301107
89. Thaiss C., Semmling V., Franken L., Wagner H., Kurts C. Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Front Immunol.*, 2011, vol. 2: 31. doi: 10.3389/fimmu.2011.00031
90. Tu Z., Hamalainen-Laanaaya H.K., Nishitani C., Kuroki Y., Crispe I.N., Orloff M.S. HCV core and NS3 proteins manipulate human blood-derived dendritic cell development and promote Th 17 differentiation. *Int. Immunol.*, 2012, vol. 24, no. 2, pp. 97–106. doi: 10.1093/intimm/dxr104
91. Ulsenheimer A., Gerlach J.T., Jung M.C., Gruener N., Wachtler M., Backmund M., Santantonio T., Schraut W., Heeg M.H., Schirren C.A., Zachoval R., Pape G.R., Diepolder H.M. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2005, vol. 41, no. 3, pp. 643–651. doi: 10.1002/hep.20592
92. Urbani S., Amadei B., Tola D., Pedrazzi G., Sacchelli L., Cavallo M.C., Orlandini A., Missale G., Ferrari C. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J. Hepatol.*, 2008, vol. 48, no. 4, pp. 548–558. doi: 10.1016/j.jhep.2007.12.014
93. Vivier E., Raulet D.H., Moretta A., Caligiuri M.A., Zitvogel L., Lanier L.L., Yokoyama W.M., Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 2011, vol. 331, no. 6013, pp. 44–49. doi: 10.1126/science.1198687

94. Waggoner S.N., Hall C.H., Hahn Y.S. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 82, no. 6, pp. 1407–1419. doi: 10.1189/jlb.0507268
95. Wertheimer A.M., Bakke A., Rosen H.R. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology*, 2004, vol. 40, no. 2, pp. 335–345. doi: 10.1002/hep.20306
96. Wilby K.J., Partovi N., Ford J.A., Greanya E., Yoshida E.M. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Can. J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 26, no. 4, pp. 205–210.
97. Yonkers N.L., Rodriguez B., Milkovich K.A., Asaad R., Lederman M.M., Heeger P.S., Anthony D.D. TLR ligand-dependent activation of naive CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis C virus infection. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 7, pp. 4436–4444. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4436
98. Yoshio S., Kanto T., Kuroda S., Matsubara T., Higashitani K., Kakita N. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2013, vol. 57, no. 5, pp. 1705–1715. doi: 10.1002/hep.26182
99. Zabaleta A., D'Avola D., Echeverria I., Llopiz D., Silva L., Villanueva L., Riezu-Boj J.I., Larrea E., Pereboev A., Lasarte J.J., Rodriguez-Lago I., Icarraiaegui M., Sangro B., Prieto J., Sarobe P. Clinical testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2015, vol. 2: 15006. doi: 10.1038/mtm.2015.6
100. Zhang S., Kodys K., Li K., Szabo G. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon- λ and amplify interferon- α in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 2013, vol. 144, no. 2, pp. 414–425. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.034
101. Zhang Z., Wang F.S. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Immunol.*, 2005, vol. 2, no. 6, pp. 411–417.
102. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 16: e74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

Авторы:

Черных Е.Р., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Олейник Е.А., аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Леплина О.Ю., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Старостина Н.М., заслуженный врач РФ, к.м.н., зав. отделением иммунологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Останин А.А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Chernykh E.R., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Oleynik E.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Starostina N.M., Honored Doctor of Russian Federation, PhD (Medicine), Head of the Immunology Department, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.09.2018
Принята к печати 03.03.2019

Received 04.09.2018
Accepted 03.03.2019

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *HELICOBACTER PYLORI* С ЭПИТЕЛИЕМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА. II. РЕАКЦИЯ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА В ОТВЕТ НА КОЛОНИЗАЦИЮ И ПЕРСИСТИРОВАНИЕ *H. PYLORI*

О.К. Поздеев¹, А.О. Поздеева¹, Ю.В. Валеева², П.Е. Гуляев³, А.Н. Савинова³

¹ Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, г. Казань, Россия

² ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

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

Резюме. Распространенность рецидивирующих воспалительных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки велика, однако роль микробов в развитии данной патологии оставалась неясной. Переломный момент в изучении этиологии воспалительных заболеваний верхних отделов пищеварительного тракта произошел после опубликования В.Ж. Marshall и J.R. Warren (1983) результатов выделения *Helicobacter pylori* со слизистой оболочки желудка больного, страдающего гастритом, и методах культивирования этих бактерий. Большинство бактерий вида *H. pylori* при колонизации организма находятся в свободном состоянии, но около 20% присоединяется к эпителиальным клеткам желудка. Были проанализированы последствия взаимодействия *H. pylori* с эпителием слизистой оболочки желудка и активации защитных механизмов, вызванных колонизацией и циркуляцией бактерий. Показано, что наряду с запуском провоспалительного ответа, индуцированного белками VacA и CagA, в котором последний способен вызывать комплекс ответных реакций, как в фосфорилированной, так и в нефосфорилированной форме, *H. pylori* повреждает межклеточные контакты, нарушает полярность и пролиферацию эпителия, активирует фосфатазы SHP-2, что приводит к развитию различных клеточных ответов. Рассмотрены механизмы запуска митоген-активируемого протеинкиназного каскада (МАРК). Обсуждены способность *H. pylori* регулировать процесс апоптоза, а именно его подавления, через экспрессию киназы ERK и белка MCL1, что облегчает его выживание на слизистой желудка, а также позитивное влияние циркуляции бактерий на выживание эпителиоцитов посредством индукции антиапоптотических факторов в клетках эпителия желудка. В значительной мере такие процессы, как активация транскрипционных факторов (NF-κB, NFAT, SRF, T-клеточный лимфоидный энхансерный фактор [TCF/LEF]), регуляция активности

Адрес для переписки:

Поздеев Оскар Кимович
420012, Россия, г. Казань, ул. Бутлерова, 36,
Казанская государственная медицинская академия.
Тел.: 8 919 693-02-04 (моб.).
E-mail: pozdeevoskar@rambler.ru

Contacts:

Oskar K. Pozdeev
420012, Russian Federation, Kazan, Butlerova str., 36,
Kazan State Medical Academy.
Phone: +7 919 693-02-04 (mobile).
E-mail: pozdeevoskar@rambler.ru

Библиографическое описание:

Поздеев О.К., Поздеева А.О., Валеева Ю.В., Гуляев П.Е., Савинова А.Н. Механизмы взаимодействия *Helicobacter pylori* с эпителием слизистой оболочки желудка. II. Реакция эпителия слизистой оболочки желудка в ответ на колонизацию и персистенцию *H. pylori* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 253–261. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-253-261

Citation:

Pozdeev O.K., Pozdeeva A.O., Valeeva Yu.V., Gulyaev P.E., Savinova A.N. Mechanisms of interacting *Helicobacter pylori* with gastric mucosal epithelium. II. A reaction of gastric epithelium on *Helicobacter pylori* colonization and persistence // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 253–261. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-253-261

белка MCL1, который в свою очередь является одним из основных антиапоптотических факторов, и индукция синтеза фактора торможения миграции (MIF) обуславливают персистенцию *H. pylori*. Рассмотрено участие цитотоксина VacA в индукции апоптоза эпителиоцитов посредством запуска каскадных реакций, осуществляемых каспазами. Инфицирование *H. pylori* сопровождается секрецией комплекса провоспалительных цитокинов, причем данные подтверждаются как *in vitro*, так и *in vivo*. Основную роль в выработке данных цитокинов играет уреаза, которая активирует транскрипционный фактор NF-κB. Кроме того, сигнальные системы эпителия желудка могут быть активированы в результате связывания бактерий с рецептором на поверхности эпителиоцитов (взаимодействие с CD74 и молекулами II класса главного комплекса гистосовместимости). Рассмотрено участие различных субпопуляций CD4⁺ Т-клеток, в частности Т-хелперов 17 (Th17), в формировании иммунного ответа к антигенам *H. pylori* в слизистой оболочке желудка.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, цитокины, эпителиоциты слизистой оболочки желудка.

MECHANISMS OF INTERACTING *HELICOBACTER PYLORI* WITH GASTRIC MUCOSAL EPITHELIUM. II. A REACTION OF GASTRIC EPITHELIUM ON *HELICOBACTER PYLORI* COLONIZATION AND PERSISTENCE

Pozdeev O.K.^a, Pozdeeva A.O.^a, Valeeva Yu.V.^b, Gulyaev P.E.^c, Savinova A.N.^c

^a Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Russian Federation

^b Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

^c Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Abstract. Gastric and duodenal recurrent inflammatory diseases have a high prevalence, but the role played by microbes in its development remained unclear. However, the data published in 1983 by Marshall and Warren about isolating *Helicobacter pylori* from the stomach mucosa of the patient with gastritis and proposing relevant cultivation methods was the turning point in investigating etiology of the upper digestive tract inflammatory disorders. Moreover, it was shown that the majority of *H. pylori* spp. are found within the gastric lumen upon colonization, whereas around 20% of them are attached to the epithelial cells in the stomach. In addition, effects of interacting *H. pylori* with gastric epithelium and activation of some defense mechanisms due to bacterial colonization and spreading were analyzed. It was found that along with triggering pro-inflammatory response induced by proteins VacA as well as phosphorylated/unphosphorylated CagA, wherein the latter is able to induce a set of protective reactions *H. pylori* disrupts intercellular contacts, affects epithelial cell polarity and proliferation, and activates SHP-2 phosphatase resulting in emerging diverse types of cellular responses. The activation mechanisms for the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway were discussed. The ability of *H. pylori* to regulate apoptosis, particularly via its suppression, by expressing ERK kinase and protein MCL1 facilitating bacterial survival in the gastric mucosa as well as beneficial effects related to bacterial circulation on gastric epithelial cell survival elicited by anti-apoptotic factors were also examined. Of note, persistence of *H. pylori* are mainly determined by activating transcriptional factors including NF-κB, NFAT, SRF, T-cell lymphoid enhancing factor (TCF/LEF), regulating activity of MCL1 protein, in turn, being one of the main anti-apoptotic factors, as well as induced production of the migration inhibitory factor (MIF). The role of VacA cytotoxin in triggering epithelial cell apoptosis via caspase-mediated pathways was also considered. Infection with *H. pylori* is accompanied by release of proinflammatory cytokine cocktail detected both *in vitro* and *in vivo*. In particular, bacterial urease activating transcriptional factor NF-κB was shown to play a crucial role in inducing cytokine production. Moreover, such signaling pathways may be activated after *H. pylori* is attached to the cognate receptor in the gastric epithelial surface by interacting with CD74 and MHC class II molecules. Finally, a role for various CD4⁺ T cell subsets, particularly type 17 T helper cells (Th17) in inducing immune response against *H. pylori* antigens in gastric mucosa was revealed were also discussed.

Key words: *Helicobacter pylori*, cytokines, gastric mucosal epitheliocytes.

Данная работа является продолжением опубликованного ранее обзора [1].

Helicobacter pylori является одним из наиболее распространенных микроорганизмов-комменсалов, колонизирующим почти 60% жителей нашей планеты, а также самых различных животных. В ходе эволюции взаимоотношений с организмом человека, в том числе находясь под «прессом» различных анти-

микробных препаратов, некоторые штаммы *H. pylori* приобрели вирулентные свойства, и с их присутствием связывают развитие атрофического гастрита типа В, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, а также злокачественных заболеваний желудка. При этом приблизительно 70% лиц, колонизированных *H. pylori*, на протяжении всей жизни являются бессимптомными бактерионосителя-

ми, а указанные заболевания регистрируют только у 12–15% инфицированных лиц. Это обстоятельство стало основанием для многочисленных дискуссий, что дало повод определить *H. pylori* как «изменчивый» патоген, способный, в зависимости от обстоятельств, вести себя либо как симбионт, либо вызывать развитие серьезных патологий. Показано, что степень риска развития заболеваний зависит от характера взаимоотношений между *H. pylori* и организмом-хозяином, обусловленных как штамм-специфичным набором факторов патогенности у микроорганизма, так и комплексом эффекторов, индуцированных у носителя.

В предыдущем обзоре мы сосредоточились на факторах патогенности *H. pylori*, способствующих колонизации и персистенции микроорганизма на слизистой оболочке желудка (СОЖ). Настоящий обзор посвящен анализу последствий прямого или непрямого (за счет действия растворимых продуктов) взаимодействия *H. pylori* с эпителием СОЖ и каскада защитных механизмов, индуцированных колонизацией и персистенцией бактерий.

Ответы эпителиальных клеток, индуцированные *H. pylori*

В ответ на проникновение в цитозоль CagA и мукопептидов посредством IV типа секреции, эпителиальные клетки отвечают синтезом провоспалительных цито- и хемокинов. Основным медиатором экспрессии этих продуктов является NF-κB, играющий роль фактора транскрипции и служащий отправной точкой для разнообразных каскадных реакций, активированных *H. pylori*. Как было указано выше, CagA является субстратом для внутриклеточных тирозинкиназ эпителиальных клеток СОЖ и может вмешиваться в процессы фосфорилирования, являющиеся ключевыми при передаче сигнала внутрь клеток от многих мембранных рецепторов. Известно, что в эукариотических клетках в ответ на воздействующий на клетку сигнал, запускаются системы передачи и усиления этого сигнала, работающие по каскадному принципу активации определенных белков в определенной последовательности. Этими белками обычно являются каскадно фосфорилирующие и активирующие друг друга протеинкиназы [14]. Фосфорилирование CagA Src-киназами по EPIYA-мотиву нарушает регуляцию различных сигнальных путей, влияющих на цитоскелет и трансформацию клеток. Тип мотива EPIYA определяет тип молекулы, с которыми в последующем будет взаимодейство-

вать фосфорилированный CagA. В частности, фосфорилирование по мотиву EPIYA-C или -D инициирует взаимодействие и активацию SHP-2-фосфатазы, ответственной за фосфорилирование тирозина при трансдукции сигнала от активированных рецепторов в эпителиальных клетках желудка [21]. Фосфатаза SHP-2 содержит 2 особых, tandemно расположенных SH2-домена, через которые фермент связывается с фосфотирозином. Белок CagA *H. pylori* взаимодействует с SH2-доменами, что резко усиливает ферментативную активность фосфатазы SHP-2. В результате активируется митоген-активируемый протеинкиназный каскад (МАРК), но также дефосфорилируются и инактивируются киназы фокальной адгезии (ФАК) [38]. МАРК-киназы представлены группой белков, включающей 3 небольших семейства протеинкиназ — p38, JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase) и ERK (extracellular signal regulated kinase). МАРК-киназы p38 и ERK1/2 играют одну из ключевых ролей в развитии воспаления. Во-первых, они фосфорилируют и, таким образом, активируют многие факторы транскрипции, в числе которых ядерный фактор NF-κB. Во-вторых, p38 и ERK1/2 обеспечивают посттранскрипционную регуляцию синтеза некоторых белков воспаления: повышают стабильность мРНК (IL-3, IL-6, IL-8, TNFα, циклоксигеназы-2 и c-fos) и регулируют ее транспорт из ядра в цитоплазму (TNFα). Практически во всех случаях активация протеинкиназ семейства ERK связана с клеточным выживанием и стимуляцией пролиферации, а активация протеинкиназ семейств p38 и JNK с индукцией апоптоза [49]. Таким образом, если в норме фосфатаза SHP-2 участвует в регуляции распластывания, миграции и адгезии клеток эпителия СОЖ, то в присутствии CagA она становится проводником его дезорганизующего влияния на эти процессы и одной из причин трансформации фенотипа клеток. К приобретению эпителиоцитами «фенотипа колибри» также приводит инактивация ФАК [38].

Нефосфорилированный CagA также способен взаимодействовать с различными внутриклеточными белками, что индуцирует комплекс ответных реакций, варьирующих от провоспалительных и митогенных, до потери клетками полярности и нарушения межклеточных контактов. Первым «партнером» для нефосфорилированного CagA в цитоплазме является адаптерный белок Grb2, передающий сигнал к белкам Ras, что активирует МАРК/ERK протеинкиназные каскады [31]. Нефосфорилированный CagA может нарушать

барьерные функции эпителия СОЖ через взаимодействие с белками плотных адгезионных контактов ZO-1 и клеточной адгезии JAM. Помимо воспалительного действия, инфицирование *H. pylori* сопровождается активацией множества ростовых факторов. Через разрушение плотных межклеточных контактов *H. pylori* получает доступ к рецепторам эпидермальных ростовых факторов (EGFR) и Her2/Neu на базолатеральных поверхностях эпителиоцитов. Присутствие бактерий в СОЖ также индуцирует активацию гепарин-связывающего EGF-подобного фактора роста, фактора роста эндотелия и т.д. Продукция этих полипептидов ускоряет клеточную пролиферацию и способствует ангиогенезу.

CagA также может активировать Ca²⁺ зависимую кальциневрин-серин/треонин-фосфатазу, дефосфорилирующую транскрипционный фактор NF-AT. Активация кальциневрина способствует транспорту NF-AT из цитоплазмы в ядра эпителиальных клеток СОЖ, что стимулирует экспрессию ряда генов, в том числе p21Cip1, кодирующего ингибиторы циклин-зависимых протеинкиназ, являющихся главными регуляторами смен фаз клеточного цикла [51]. CagA кроме того индуцирует феномен «рассеивания клеток», известный также как «мотогенный ответ» посредством связывания с рецептором c-Met, кодирующего рецептор фактора роста гепатоцитов [12]. Этот механизм реализуется через активацию Rho-ГТФаз Rac1 и Cdc42, зависящую от «острова патогенности» cag. В «мотогенный ответ» также вовлекаются MAP-киназы ERK1/2 и MEK1/2, активированные внеклеточными сигналами *H. pylori*. Последующие эффекты связывания c-Met рецептора включают фосфорилирование тирозинкиназами белка Gab1, ассоциированного с Grb2, что приводит к дополнительной активации внутриклеточных сигнальных и регуляторных белков, таких как фосфатидилинозит-3-киназа (PI3-K), белок Grb2, фосфолипаза C γ (PLC γ) и фосфатаза SHP-2 [26, 47].

В стимулировании провоспалительного ответа участвует и цитотоксин VacA. Субъединица В также способна взаимодействовать с внутриклеточными сигнальными молекулами — белковыми тирозинфосфатазами рецепторного типа PTP α и PTP β , что усиливает формирование вакуолей в эпителиоцитах [17]. Также VacA индуцирует апоптоз эпителиоцитов СОЖ через образование пор в цитоплазматической мембране, что индуцирует выход цитохрома С из митохондрий. Цитохром С активирует в присутствии определенных кофакторов каскад реакций, осуществляемых каспазами. Взаимодействие АТФ или дАТФ с клеточным цитозольным белком Araf-1 (Apoptotic peptidase

activating factor 1) с последующим прикреплением к этому белку цитохрома С приводит к изменению конформации молекулы Araf-1, к которой затем присоединяется прокаспаза-9. В результате этого эта протеаза переходит в активную форму. Затем каспаза-9 расщепляет прокаспазу-3, превращая ее в активную протеазу, каспазу-3, а та, в свою очередь, активирует каспазу-6, затем последовательно активируются фактор фрагментации ДНК 3, поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP) и другие ферменты, действие которых приводит ко всем проявлениям апоптоза [50].

Кроме того, сигнальные системы в эпителии СОЖ могут быть активированы не только действием конкретных факторов патогенности *H. pylori*, но и следствием связывания бактерий с рецептором на поверхности эпителиоцитов. Показано, что субъединица В уреазы *H. pylori* способна взаимодействовать с CD74 и молекулами II класса главного комплекса гистосовместимости (МНС) [8, 9, 18, 19]. Взаимодействие с молекулами II класса МНС запускает комплекс внутриклеточных сигналов, включая активацию фосфолипазы С, киназ PKC, Src и Syk, а также митоген-активируемых киназ p38 и Erk, что приводит к стимуляции секреции провоспалительных цитокинов и активации проапоптотических стимулов [2]. Показано, что CagA *H. pylori* индуцирует фактор торможения миграции макрофагов (MIF) эпителием СОЖ [10]. В свою очередь MIF, используя лиганд CD74 в качестве рецептора, запускает сигнальные пути, ассоциированные с NF- κ B, Erk1/2 и AP-1 [22, 32]. Также взаимодействие субъединицы В уреазы *H. pylori* с CD74 активирует NF- κ B и стимулирует образование IL-8 [9].

Эффекты колонизации СОЖ *H. pylori*

Запуск сигнальных каскадов в эпителии СОЖ, индуцированных адгезией *H. pylori*, либо секрецией растворимых медиаторов, приводит к различным эффектам, начиная от нарушения барьерных функций до развития воспалительного и проканцерогенного процессов. Другим следствием активации/дисрегуляции сигнальных каскадов является извращение иммунных реакций, что приводит к хронизации процесса.

Нарушение барьерных функций СОЖ. Как было указано выше, эпителиальные клетки СОЖ связаны между собой с помощью десмосом, щелевых коммуникационных соединений, плотных замыкающих соединений, образующих, в целом, барьер между содержимым полости желудка и внутренней средой организма. Показано, что *H. pylori* повреждает межклеточные контакты, нарушает

полярность и пролиферацию эпителия через взаимодействие с мембранными рецепторами и активацию различных сигнальных путей. В цитозоле энтероцитов CagA, фосфорилируемый Src-киназами, активирует фосфатазу SHP-2, что приводит к развитию различных клеточных ответов, включая нарушения плотных и адгезивных контактов СОЖ через взаимодействие с молекулами клеточной адгезии E-кадгерин, ZO-1 и JAM [3, 20]. E-кадгерин представляет собой трансмембранный Ca^{2+} -гликопротеин, осуществляющий адгезивные межклеточные контакты типа «зона слипания». Молекула E-кадгерина, встроенная в цитоплазматическую мембрану, имеет внеклеточную, трансмембранную и внутриклеточную области. Внутриклеточные домены через цепь взаимосвязанных цитоплазматических белков связываются с актиновыми микрофиламентами через β -катенин и некоторые другие белки. Комплекс E-кадгерин/ β -катенин формируется и транспортируется на цитоплазматическую мембрану, где играет важнейшую роль во взаимодействии клеток и поддержании архитектуры эпителиальных тканей. CagA, транслоцированный в цитозоль посредством IV типа секреции, дестабилизирует комплекс E-кадгерин/ β -катенин. Механизмы этой дестабилизации остаются до конца не изученными: предположительно, CagA может конкурировать с β -катенином в связывании E-кадгерина. Дестабилизация комплекса E-кадгерин/ β -катенин приводит к высвобождению и накоплению β -катенина в цитоплазме и ядрах эпителиоцитов с последующей активацией сигнального каскада, опосредованного β -катенином, что приводит к трансформации эпителия СОЖ [34]. Кроме того, в цитозоле эпителиоцитов СОЖ CagA индуцирует транслокацию мембранного белка плотного соединения ZO-1 к базолатеральной поверхности клетки [4, 6, 40]. В дополнение к повреждению межклеточных контактов, CagA *H. pylori* может изменять полярность эпителиоцитов через взаимодействие с комплексом PAR1/MARK-киназа, дестабилизирующим микротрубочки через последовательное фосфорилирование MAP-киназ [27, 40]. Показано, что нарушение полярности эпителия СОЖ является одним из способов повышения выживаемости *H. pylori* на нем [44].

Индукция апоптоза в эпителиоцитах СОЖ H. pylori. Непрерывное и быстрое обновление клеток в эпителиальных слоях является эволюционным защитным механизмом, снижающим возможности для микробной колонизации. *H. pylori* взаимодействует с рецепторами на апикальных поверхностях эпителиальных клеток СОЖ, а для обеспечения своего последующего

персистирувания бактерии используют различные механизмы. Один из них связан с нарушением баланса между обновлением и пролиферацией эпителиоцитов [30, 41]. Важнейшим механизмом обновления является апоптоз — высококонсервативный регуляторный процесс поддержания гомеостаза за счет удаления старых или поврежденных клеток. *H. pylori* запускает ускоренную программу апоптоза в эпителиоцитах, что стимулирует компенсаторную пролиферативную активность СОЖ [5, 36]. Показано, что способность регулировать этот процесс *H. pylori* использует для облегчения выживания на эпителии СОЖ [23, 30]. В частности, колонизация эпителия запускает механизмы выживания через более активную экспрессию киназы ERK и короткоживущего белка MCL1, являющихся важными факторами, подавляющими апоптоз, что увеличивает выживаемость бактерий [30].

Как было указано выше, уреазы, фосфолипазы, VacA и другие продукты *H. pylori* вызывают повреждение эпителия СОЖ, стимулируют воспалительный и иммунный ответы, а также регулируют апоптоз эпителиоцитов. Запуск программы апоптоза эпителиоцитов также реализуется через повреждения ДНК, имеющие место при развитии местных защитных реакций. Они могут быть вызваны супероксидными радикалами, образуемыми активированными нейтрофилами либо действием Th1-цитокинов (TNF α , TNF γ), выделяемыми Th1-субпопуляцией Т-хелперов [48]. Кроме того, взаимодействие уреазы *H. pylori* с антигенами II класса МНС также стимулирует апоптоз эпителия СОЖ [18, 19]. В то же время IFN γ , выделяемый Th1-субпопуляцией CD4⁺ клеток, также способен опосредовано усиливать апоптоз за счет увеличения плотности антигенов II класса МНС на мембранах эпителиоцитов, с которыми связывается уреазы *H. pylori*, что запускает апоптоз [18].

Как это ни парадоксально, *H. pylori* также может оказывать и позитивное влияние на выживание эпителиоцитов и запуск антиапоптотических программ в эпителии СОЖ. После транслокации в цитоплазму клетки CagA посредством сигнальных каскадов активирует факторы транскрипции, такие как NF- κ B, NFAT, SRF, Т-клеточный/лимфоидный энхансерный фактор (TCF/LEF) [3, 20, 46]. Активация этих транскрипционных стимулов приводит к увеличению образования циклина D1, специфически регулирующего фазовый переход G1/S в клеточном цикле, что усиливает пролиферацию эпителиоцитов [11]. В исследовании с моделированием инфекции *H. pylori* у монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) было установлено, что бактерии подавляли

апоптоз эпителиоцитов СОЖ. В цитоплазме эпителиальных клеток CagA регулирует активность белка MCL1 (myeloid cell leukemia-1), являющегося одним из основных антиапоптотических факторов, и ERK1/2-модуля MAPK-сигнального каскада, стимулирующего пролиферацию. В значительной мере активация антиапоптотических стимулов обуславливает персистенцию *H. pylori* [30]. Другой механизм стимулирования эпителия СОЖ к пролиферации связан с индукцией синтеза MIF клетками [9]. Пролиферативный ответ является следствием связывания MIF с молекулами CD74, экспрессия которых на апикальной поверхности увеличивается при микробной колонизации, где с CD74 может взаимодействовать *H. pylori* [7, 8]. Также MIF ингибирует фосфорилирование p53, что является антиапоптотическим стимулом, и усиливает внутриклеточную экспрессию ингибитора апоптоза [10]. Кроме того, N-терминальный конец CagA взаимодействует с ASPP2 — супрессором апоптоз-стимулирующего белка p53, что изменяет конформацию последнего. Измененный ASPP2 связывается с p53, что, в итоге, приводит к его протеосомной деградации [19].

Секреция цитокинов. Колонизация *H. pylori* сопровождается секрецией комплекса провоспалительных цитокинов, некоторые из которых выделяет эпителий СОЖ. Среди них первым был идентифицирован IL-8. Показано, что бактерии стимулируют секрецию цитокина *in vitro* и *in vivo*, а его экспрессия связана с транслокацией CagA [13, 16, 29, 37]. Также показано, что в ответ на колонизацию *H. pylori* эпителиоциты секретируют IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-1 α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1), MIF и трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β) [9, 10, 24, 45]. Среди факторов патогенности *H. pylori*, обуславливающих синтез этих цитокинов, ведущая роль принадлежит уреазе. Показано, что фермент индуцирует образование IL-6 и TNF α *in vitro* и *in vivo* [15, 45]. Субъединица В уреазы активирует транскрипционный фактор NF- κ B, а образование IL-8 индуцирует взаимодействие субъединицы с мембранными молекулами CD74 на поверхности эпителиоцитов [9]. Транслокация CagA в эпителий СОЖ также стимулирует образование IL-8 [13, 16, 35]. Мутантные штаммы *H. pylori*, дефектные по CagA, слабо влияют на образование мРНК IL-8 и собственно IL-8 [13]. Также была установлена способность неидентифицированных продуктов «острова патогенности» Cag и OipA стимулировать секрецию IL-6 клетками эпителия желудка линии MKN-28 *in vitro* [28].

В то время как синтез ряда цитокинов эпителием желудка индуцирован факторами патогенности *H. pylori*, фактически в организме человека существует сложная сеть взаимодействий, некоторые из которых включают факторы других клеток, инфильтрирующих СОЖ.

Показано, что в формировании иммунного ответа к антигенам *H. pylori* в слизистой желудка участвуют различные субпопуляции CD4⁺ Т-клеток. В частности, установлено, что ведущая роль в его развитии в СОЖ принадлежит Т-хелперам 17 (Th17) [39, 43]. Колонизация *H. pylori* повышает IL-17 в СОЖ человека и лабораторных животных. У человека повышение уровней IL-17 индуцирует секрецию IL-8 через активацию ERK 1/2 MAP-киназного пути, а IL-8 служит аттрактантом для нейтрофилов, что, в конечном итоге, стимулирует воспалительный ответ. У пациентов, страдающих *H. pylori*-ассоциированным гастритом, выявлено повышение уровней транскрипции РНК IL-17 и его секреции. При моделировании *H. pylori*-инфекции у мышей, нарастание уровней IL-17 в СОЖ отмечали в течение трех недель и сохранение на протяжении 12 месяцев после инфицирования [25]. Аналогичные результаты были получены и при моделировании инфекции у монгольских песчанок, особенно на стадии хронизации процесса [33]. Поскольку эпителий СОЖ экспрессирует рецепторы к IL-17, связывание цитокина стимулирует эпителиоциты к образованию IL-8 [25]. Кроме того, у пациентов, инфицированных *H. pylori*, выявлено повышенное образование IL-21 и IL-23 — цитокинов, стимулирующих и поддерживающих секрецию IL-17. При этом показано, что синтез IL-23 не связан с активностью CagA [25, 42].

В заключение следует отметить, что несмотря на то, что на протяжении последних 30–35 лет *H. pylori* является объектом многочисленных исследований, существуют проблемы, требующие своего дальнейшего изучения, в частности, факторы, определяющие прогрессирование атрофического гастрита до развития пептических язв и болезней злокачественного роста. В данном обзоре представлены сведения о событиях, развивающихся при непосредственном взаимодействии бактерий с эпителием СОЖ. Но во внимание следует принимать и прочие эффекты, оказываемые *H. pylori* на другие клетки организма человека, способные, в свою очередь, значительно изменять локальную обстановку в СОЖ. В первую очередь это касается иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих слизистую в ответ на многолетнюю микробную колонизацию. Несмотря на мобилизацию защитных механизмов, хеликобактеры вполне успешно избе-

гают их действия, в том числе и за счет манипулирования функциональной активностью эпителиоцитов.

Можно полагать, что дальнейшее изучение комплекса механизмов, обеспечивающих дли-

тельное персистирование *H. pylori*, позволит разработать комплекс мероприятий, способных предотвратить развитие язвенных гастродуоденитов и злокачественных трансформаций эпителиа СОЖ.

Список литературы/References

1. Поздеев О.К., Поздеева А.О., Валеева Ю.В., Гуляев П.Е. Механизмы взаимодействия *Helicobacter pylori* с эпителием слизистой оболочки желудка. I. Факторы патогенности, способствующие успешной колонизации // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 273–283. [Pozdeev O.K., Pozdeeva A.O., Valeeva Yu.V., Gulyaev P.E. Mechanisms of interaction of *Helicobacter pylori* with epithelium of gastric mucosa. I. Pathogenic factors promoting successful colonization. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 273–283. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-273-283 (In Russ.)]
2. Al-Daccak R., Mooney N., Charron D. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004, vol. 16, no. 1, pp. 108–113. doi: 10.1016/j.coi.2003.11.006
3. Amieva M.R., El-Omar E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, no. 1, pp. 306–323. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.009
4. Amieva M.R., Vogelmann R., Covacci A., Tompkins L.S., Nelson W.J., Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, 2003, vol. 300, no. 5624, pp. 1430–1434. doi: 10.1126/science.1081919
5. Ashktorab H., Dashwood R.H., Dashwood M.M., Zaidi S.I., Hewitt S.M., Green W.R., Lee E.L., Darempouran M., Nouraie M., Malekzadeh R., Smoot D.T. *H. pylori*-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria. *Helicobacter*, 2008, vol. 13, no. 6, pp. 506–517. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00646.x
6. Bagnoli F., Buti L., Tompkins L., Covacci A., Amieva M.R. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 45, pp. 16339–16344. doi: 10.1073/pnas.0502598102
7. Barrera C.A., Beswick E.J., Sierra J.C., Bland D., Espejo R., Mifflin R., Adegboyega P., Crowe S.E., Ernst P.B. Polarized expression of CD74 by gastric epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 2005, vol. 53, no. 12, pp. 1481–1489. doi: 10.1369/jhc.4A6552.2005
8. Beswick E.J., Bland D.A., Suarez G., Barrera C.A., Fan X.J., Reyes V.E. *Helicobacter pylori* binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 5, pp. 2736–2743. doi: 10.1128/IAI.73.5.2736-2743.2005
9. Beswick E.J., Pinchuk I.V., Minch K., Suarez G., Sierra J.C., Yamaoka Y., Reyes V.E. The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 2, pp. 1148–1155. doi: 10.1128/IAI.74.2.1148-1155.2006
10. Beswick E.J., Pinchuk I.V., Suarez G., Sierra J.C., Reyes V.E. *Helicobacter pylori* CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176, no. 11, pp. 6794–6801. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6794
11. Chang Y.J., Wu M.S., Lin J.T., Pestell R.G., Blaser M.J., Chen C.C. Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. *Cell. Microbiol.*, 2006, vol. 8, no. 11, pp. 1740–1752. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00743.x
12. Churin Y., Al-Ghoul L., Kepp O., Meyer T.E., Birchmeier W., Naumann M. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response. *J. Cell. Biol.*, 2003, vol. 161, no. 2, pp. 249–255. doi: 10.1083/jcb.200208039
13. Crabtree J.E., Farmery S.M., Lindley I.J., Figura N., Peichl P., Tompkins D.S. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J. Clin. Pathol.*, 1994, vol. 47, no. 10, pp. 945–950. doi: 10.1136/jcp.47.10.945
14. Crabtree J.E., Naumann M. Epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Signal Transd.*, 2006, vol. 1, no. 1, pp. 53–65. doi: 10.2174/157436206775269253
15. Crabtree J.E., Shallcross T.M., Heatley R.V., Wyatt J.I. Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut*, 1991, vol. 32, no. 12, pp. 1473–1477. doi: 10.1136/gut.32.12.1473
16. Crabtree J.E., Wyatt J.I., Trejdosiewicz L.K., Peichl P., Nichols P.H., Ramsay N., Primrose J.N., Lindley I.J.D. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.*, 1994, vol. 47, no. 1, pp. 61–66. doi: 10.1136/jcp.47.1.61
17. De Guzman B.B., Hisatsune J., Nakayama M., Yahiro K., Wada A., Yamasaki E., Nishi Y., Yamazaki S., Azuma T., Ito Y., Ohtani M., van der Wijk T., den Hertog J., Moss J., Hirayama T. Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatases, RPTPalpha and RPTPbeta, by *Helicobacter pylori* m2VacA. *Cell. Microbiol.*, 2005, vol. 7, no. 9, pp. 1285–1293. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00556.x
18. Fan X., Crowe S.E., Behar S., Gunasena H., Ye G., Haerberle H., Van Houten N., Gourley W.K., Ernst P.B., Reyes V.E. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, no. 10, pp. 1659–1669. doi: 10.1084/jem.187.10.1659
19. Fan X., Gunasena H., Cheng Z., Espejo R., Crowe S.E., Ernst P.B., Reyes V.E. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 4, pp. 1918–1924. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.1918
20. Fischer W., Prassl S., Haas R. Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009, vol. 337, pp. 129–171. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6_5
21. Higashi H., Tsutsumi R., Muto S., Sugiyama T., Azuma T., Asaka M., Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 2002, vol. 295, no. 5555, pp. 683–686. doi: 10.1126/science.1067147

22. Ishiguro Y., Ohkawara T., Sakuraba H., Yamagata K., Hiraga H., Yamaguchi S., Fukuda S., Munakata A., Nakane A., Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor has a proinflammatory activity via the p38 pathway in glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Clin. Immunol.*, 2006, vol. 120, no. 3, pp. 335–341. doi: 10.1016/j.clim.2006.05.010
23. Iwai H., Kim M., Yoshikawa Y., Ashida H., Ogawa M., Fujita Y., Muller D., Kirikae T., Jackson P.K., Kotani S., Sasakawa C. A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell*, 2007, vol. 130, no. 4, pp. 611–623. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.043
24. Jung H.C., Kim J.M., Song I.S., Kim C.Y. Helicobacter pylori induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1997, vol. 12, no. 7, pp. 473–480. doi: 10.1111/j.1440-1746.1997.tb00469.x
25. Kabir S. The role of interleukin-17 in the Helicobacter pylori induced infection and immunity. *Helicobacter*, 2011, vol. 16, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00812.x
26. Keates S., Keates A.C., Warny M., Peek R.M. Jr, Murray P.G., Kelly C.P. Differential activation on of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag– Helicobacter pylori. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, no. 10, pp. 5552–5559.
27. Lu H., Murata-Kamiya N., Saito Y., Hatakeyama M. Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of Helicobacter pylori CagA. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 34, pp. 23024–23036. doi: 10.1074/jbc.M109.001008
28. Lu H., Wu J.Y., Kudo T., Ohno T., Graham D.Y., Yamaoka Y. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with Helicobacter pylori. *Mol. Biol. Cell*, 2005, vol. 16, no. 10, pp. 4954–4966. doi: 10.1091/mbc.E05-05-0426
29. Matsushima K., Shiroo M., Kung H.F., Copeland T.D. Purification and characterization of a cytosolic 65-kilodalton phosphoprotein in human leukocytes whose phosphorylation is augmented by stimulation with interleukin 1. *Biochemistry*, 1988, vol. 27, no. 10, pp. 3765–3770. doi: 10.1021/bi00410a037
30. Mimuro H., Suzuki T., Nagai S., Rieder G., Suzuki M., Nagai T., Fujita Y., Nagamatsu K., Ishijima N., Koyasu S., Haas R., Sasakawa C. Helicobacter pylori dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe*, 2007, vol. 2, no. 4, pp. 250–263. doi: 10.1016/j.chom.2007.09.005
31. Mimuro H., Suzuki T., Tanaka J., Asahi M., Haas R., Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities. *Mol. Cell*, 2002, vol. 10, no. 4, pp. 745–755. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00681-0
32. Mitchell R.A., Liao H., Chesney J., Fingerle-Rowson G., Baugh J., David J., Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 1, pp. 345–350. doi: 10.1073/pnas.012511599
33. Mizuno T., Ando T., Nobata K., Tsuzuki T., Maeda O., Watanabe O., Minami M., Ina K., Kusugami K., Peek R.M., Goto H. Interleukin-17 levels in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J. Gastroenterol.*, 2005, vol. 11, no. 40, pp. 6305–6311. doi: 10.3748/wjg.v11.i40.6305
34. Murata-Kamiya N., Kurashima Y., Teishikata Y., Yamahashi Y., Saito Y., Higashi H., Aburatani H., Akiyama T., Peek R.M., Azuma T., Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, 2007, vol. 26, no. 32, pp. 4617–4626. doi: 10.1038/sj.onc.1210251
35. Odenbreit S., Kavermann H., Püls J., Haas R. CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by Helicobacter pylori are independent from alpAB, HopZ and bab group outer membrane proteins. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2002, vol. 292, no. 3–4, pp. 257–266. doi: 10.1078/1438-4221-00205
36. Olivares D., Gisbert J.P., Pajares J.M. Helicobacter pylori infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2005, vol. 97, no. 7, pp. 505–520.
37. Oppenheim J.J., Zachariae C.O., Mukaida N., Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, pp. 617–648. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.003153
38. Parsons J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell. Science*, 2003, vol. 116, no. 8, pp. 1409–1416. doi: 10.1242/jcs.00373
39. Pinchuk I.V., Morris K.T., Nofchissey R.A., Earley R.B., Wu J.Y., Ma T.Y., Beswick E.J. Stromal cells induce Th17 during Helicobacter pylori infection and in the gastric tumor microenvironment. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 1, pp. e53798. doi: 10.1371/journal.pone.0053798
40. Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y., Lu H.S., Ohnishi N., Azuma T., Suzuki A., Ohno S., Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, 2007, vol. 447, no. 7142, pp. 330–333. doi: 10.1038/nature05765
41. Saberi S., Douraghi M., Azadmanesh K., Shokrgozar M.A., Zeraati H., Hosseini M.E., Mohagheghi M.A., Parsaeian M., Mohammadi M. A potential association between Helicobacter pylori CagA EPIYA and multimerization motifs with cytokeratin 18 cleavage rate during early apoptosis. *Helicobacter*, 2012, vol. 17, no. 5, pp. 350–357. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00954.x
42. Sebkova L., Pellicanò A., Monteleone G., Grazioli B., Guarnieri G., Imeneo M., Pallone F., Lizza F. Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 9, pp. 5019–5026. doi: 10.1128/IAI.72.9.5019-5026.2004
43. Shi Y., Liu X.F., Zhuang Y., Zhang J.Y., Liu T., Yin Z., Wu C., Mao X.H., Jia K.R., Wang F.J., Guo H., Flavell R.A., Zhao Z., Liu K.Y., Xiao B., Guo Y., Zhang W.J., Zhou W.Y., Guo G., Zou Q.M. Helicobacter pylori-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, no. 9, pp. 5121–5129. doi: 10.4049/jimmunol.0901115
44. Tan S., Tompkins L.S., Amieva M.R. Helicobacter pylori usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 5: e1000407. doi: 10.1371/journal.ppat.1000407
45. Tanahashi T., Kita M., Kodama T., Yamaoka Y., Sawai N., Ohno T., Mitsufuji S., Wei Y.P., Kashima K., Imanishi J. Cytokine expression and production by purified Helicobacter pylori urease in human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 2, pp. 664–671. doi: 10.1128/IAI.68.2.664-671.2000

46. Wessler S., Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.*, 2008, vol. 16, no. 8, pp. 397–405. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.005
47. Wessler S., Höcker M., Fischer W., Wang T.C., Rosewicz S., Haas R., Wiedenmann B., Meyer T.F., Naumann M. *Helicobacter pylori* activates the histidine decarboxylase promoter through a mitogen-activated protein kinase pathway independent of pathogenicity island-encoded virulence factors. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, no. 5, pp. 3629–3636. doi: 10.1074/jbc.275.5.3629
48. Xia H.H., Talley N.J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am. J. Gastroenterol.*, 2001, vol. 96, no. 1, pp. 16–26. doi: 10.1016/S0002-9270(00)02240-1
49. Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., Greenberg M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 1995, vol. 270, no. 5240, pp. 1326–1331. doi: 10.1126/science.270.5240.1326
50. Xiong S., Mu T., Wang G., Jiang X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell.*, 2014, vol. 5, no. 10, pp. 737–749. doi: 10.1007/s13238-014-0089-1
51. Yokoyama K., Higashi H., Ishikawa S., Fujii Y., Kondo S., Kato H., Azuma T., Wada A., Hirayama T., Aburatani H., Hatakeyama M. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 27, pp. 9661–9666. doi: 10.1073/pnas.0502529102

Авторы:

Поздеев О.К., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия;

Поздеева А.О., ассистент кафедры терапии и семейной медицины Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия;

Валеева Ю.В., к.м.н., доцент кафедры неотложной медицинской помощи и симуляционной медицины ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

Гуляев П.Е., ассистент кафедры микробиологии, ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия;

Савинова А.Н., к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия.

Authors:

Pozdeev O.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russian Federation;

Pozdeeva A.O., Assistant of the Department of Therapy and Family Medicine, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russian Federation;

Valeeva Yu.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Emergency Medical Care and Simulatory Medicine, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation;

Gulyaev P.E., Assistant of the Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Savinova A.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.04.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 05.04.2019

Received 03.04.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 05.04.2019

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИИ ЖИВОТНЫХ С РАЗНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ

А.А. Горбатов¹, Г.М. Титарева¹, Т.И. Комбарова¹, Р.З. Шайхутдинова¹,
Т.Б. Кравченко¹, Р.И. Миронова¹, И.В. Бахтеева¹, Н.В. Аронова², Н.В. Павлович²,
А.Н. Мокриевич¹, В.В. Фирстова¹

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

² ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Туляремия является антропозоонозной инфекцией, вызываемой бактериями *Francisella tularensis*. В клинической и санитарно-эпидемиологической практике традиционными методами диагностики этого заболевания являются серологические реакции по обнаружению специфических антител, которые служат основанием для постановки диагноза у больного и позволяют оценивать напряженность иммунитета вакцинированных людей. Ранее было показано, что специфические антитела в сыворотке крови переболевших туляремией людей, в отличие от вакцинированных живой туляремийной вакциной *F. tularensis* 15 НИИЭГ, могут взаимодействовать со специфическими эпитопами на молекулах липополисахаридов, выделенных из штаммов различных подвидов — *F. tularensis* (ЛПС Ft) и *F. novicida* (ЛПС Fn), тогда как в сыворотках крови вакцинированных людей иммуноглобулины к ЛПС Fn отсутствуют. Нами были проведены эксперименты по выявлению антител, обладающих сходной специфичностью, с использованием лабораторных животных различных видов — мышей, морских свинок и крыс, обладающих различной чувствительностью к туляремии, и штамма живой туляремийной вакцины и вирулентных штаммов для моделирования вакцинального и инфекционного процессов соответственно. Разработан методический подход, позволяющий проводить анализ гуморального ответа при моделировании инфекционного процесса у высокочувствительных к туляремии животных — мышей линии BALB/c и морских свинок, заключающийся в предварительной иммунизации живой туляремийной вакциной с последующим заражением вирулентными штаммами *F. tularensis*. Было показано, что у животных этих видов как после вакцинации, так и после заражения вирулентными штаммами происходит индукция специфических антител к ЛПС Ft. Было отмечено, что для мышей, в отличие от морских свинок и крыс, как при вакцинации, так и при заражении характерны значительно более низкие титры специфических ЛПС Ft-антител. Не удалось обнаружить специфического взаимодействия мышьиной сыворотки с ЛПС Fn. У морских свинок, иммунизированных живой туляремийной вакциной с последующим заражением вирулентным штаммом, с помощью дот-блота было выявлено присутствие иммуноглобулинов с различной антигенной специфичностью к эпитомам ЛПС Ft и ЛПС Fn. В сыворотках крыс также появля-

Адрес для переписки:

Горбатов Алексей Александрович
142279, Россия, Московская область, Серпуховский р-н,
п. Оболенск, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03. Факс: 8 (4967) 36-00-10.
E-mail: gorbатов1986@mail.ru

Contacts:

Alexey A. Gorbatov
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology and
Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-00-03. Fax: +7 (4967) 36-00-10.
E-mail: gorbатов1986@mail.ru

Библиографическое описание:

Горбатов А.А., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З.,
Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Бахтеева И.В., Аронова Н.В.,
Павлович Н.В., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Особенности
гуморального ответа при экспериментальной туляремии животных
с разной чувствительностью к инфекции // Инфекция и иммунитет.
2019. Т. 9, № 2. С. 262–272. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-262-272

Citation:

Gorbato A.A., Titareva G.M., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z.,
Kravchenko T.B., Mironova R.I., Bakhteeva I.V., Aronova N.V., Pavlovich N.V.,
Mokrievich A.N., Firstova V.V. Features of humoral answer in experimental
animal tularemia with different sensitivity to infection // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2,
pp. 262–272. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-262-272

лись антитела к ЛПС Fn при их инфицировании вирулентными, но не вакцинным, штаммами. Таким образом, на модели экспериментальной туляремии с использованием крыс и морских свинок были подтверждены полученные ранее данные о формировании иммуноглобулинов с различной антигенной специфичностью и продемонстрирована диагностическая значимость и целесообразность использования ЛПС Fn для подтверждения туляремийной инфекции у людей.

Ключевые слова: экспериментальная туляремия, липополисахарид *F. tularensis*, липополисахарид *F. novicida*, O-антиген, специфические антитела.

FEATURES OF HUMORAL ANSWER IN EXPERIMENTAL ANIMAL TULAREMIA WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO INFECTION

Gorbatov A.A.^a, Titareva G.M.^a, Kombarova T.I.^a, Shaikhutdinova R.Z.^a, Kravchenko T.B.^a, Mironova R.I.^a, Bakhteeva I.V.^a, Aronova N.V.^b, Pavlovich N.V.^b, Mokrievich A.N.^a, Firstova V.V.^a

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

^b Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Tularemia is an anthroponozoonotic infection caused by *Francisella tularensis*. In clinical and sanitary-epidemiological practice, traditional diagnostics methods in tularemia are based on serological assays for detecting specific antibodies, allowing to diagnose it and estimate durability of patients' immunity after vaccination. Previously, it was shown that specific serum antibodies in patients recovered after tularemia, unlike to those vaccinated with the live tularemia vaccine *F. tularensis* 15 NIIEG, can interact with specific epitopes on lipopolysaccharides isolated from strains of various subspecies — *F. tularensis* (Ft) and *F. novicida* (LPS Fn), while LPS Fn-specific immunoglobulins are lacked in the blood of vaccinated individuals. A set of experiments on identifying antibodies with similar specificity in laboratory animals of various species — mice, guinea pigs and rats with differed sensitivity to tularemia, administered with live tularemia vaccine strain as well as virulent *F. tularensis* strains to simulate vaccine-mediated and infectious processes, respectively was conducted. A methodical approach has been developed that allows to analyze humoral response in modelled infectious process in animals highly sensitive to tularemia such as BALB/c mice and guinea pigs that consisted of preliminary immunization with live tularemia vaccine followed by infection with virulent *F. tularensis* strains. It was shown that induction of specific anti-LPS Ft antibodies occurred in these animal species, both after vaccination and infection with virulent strains. It was noted that, unlike guinea pigs and rats, mice both during vaccination and infection were characterized by significantly lower titers of LPS Ft-specific antibodies. However, no specific interaction between mouse serum and LPS Fn might be detected. Moreover, two types of immunoglobulins with different antigen specificities to the LPS Ft and LPS Fn epitopes were detected by dot-blot analysis in guinea pigs immunized with live tularemia vaccine, followed by infection with a virulent strain. In addition, antibodies to LPS Fn were also detected in the serum of rats infected with virulent, but not vaccine-based, *F. tularensis* strains. Thus, previous experimental data on the production of immunoglobulins with different antigenic specificity were confirmed in an experimental tularemia modelled in rats and guinea pigs that demonstrated a diagnostic significance and feasibility of using LPS Fn to confirm tularemia infection in humans.

Key words: experimental tularemia, lipopolysaccharide *F. tularensis*, lipopolysaccharide *F. novicida*, O-antigen, specific antibodies.

Введение

Туляремия является антропозоонозной инфекцией, вызываемой бактериями *Francisella tularensis*. Этот возбудитель патогенен для млекопитающих многих видов, особенно для грызунов и некоторых насекомоядных животных. Периодические вспышки массовых заболеваний людей, сохранение стабильных эпизоотически активных природных очагов туляремии требуют совершенствования серодиагностики этого заболевания.

В клинической и санитарно-эпидемиологической практике традиционными методами при диагностике являются серологические реакции, направленные на обнаружение специфических противотуляремийных антител,

которые служат основанием для постановки диагноза у больного и позволяют оценивать напряженность иммунитета вакцинированных людей. Кроме этого, выявление антител у животных имеет важное значение для мониторинга эпизоотий туляремии. Учитывая, что в эндемичных районах проводится регулярная вакцинация людей против туляремии (только в 2017 г. в Российской Федерации было вакцинировано 1 128 154 человек) [3], существует необходимость дифференцировать природу происхождения специфических антител (инфекционные или вакцинальные) в каждом конкретном случае.

Одним из наиболее значимых антигенов при диагностике туляремии является липополисахарид (ЛПС) — основной компонент клеточной стенки возбудителя. В настоящее время при-

нято различать четыре подвида туляремийного микроба: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (тип В), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* subsp. *novicida* [9], при этом ЛПС трех первых, эпидемически значимых, подвидов имеет одинаковую структуру. Известно, что макромолекула ЛПС может быть условно разделена на 3 домена. Липид А — высокогидрофобная часть молекулы. К нему ковалентно присоединяется коровая часть, которая соединена с полимером из повторяющихся сахаров, называемым О-полисахаридом, или О-антигеном. Липид А является своего рода «якорем», закрепляющим молекулы ЛПС в мембране за счет гидрофобных взаимодействий друг с другом и с фосфолипидным слоем [7, 11, 12, 13, 14, 21]. У *F. tularensis*, как и у большинства грам-отрицательных бактерий, липид А представляет собой фосфолирированный дисахарид, построенный из двух остатков D-глюкозамина, ацилированный четырьмя жирнокислотными остатками [8]. Как правило, антигенные детерминанты расположены на О-полисахариде, который и обуславливает иммунологическую индивидуальность серотипов, штаммов, подвидов микроорганизмов. Спектр вырабатываемых макроорганизмом антител зависит от структуры и длины О-антигена.

Химическая структура О-антигена липополисахарида разных подвидов *F. tularensis*, являющаяся вместе с кором гидрофильной частью молекулы, хорошо изучена. Для голарктического, среднеазиатского и неарктического подвидов он представляет собой повторяющийся тетрасахарид, состоящий из последовательно соединенных углеводов α -D-GalNAcAN и α -D-GalNAcAN, которые соединены с β -D-QuiNAc и β -DQui4NFm. Структура О-антигена *F. novicida* также представляет собой повторяющийся тетрасахарид, но имеет некоторые отличия: вместо β -DQui4NFm имеется еще один остаток α -D-GalNAcAN, а вместо β -D-QuiNAc — остаток β -DQui2NAc4NAc [8, 18, 19].

Ранее было показано, что при инфекционном процессе у человека вырабатываются специфические антитела, которые связываются как с ЛПС *F. tularensis*, так и с ЛПС *F. novicida*, в то время как у вакцинированных живой туляремийной вакциной обнаруживаются антитела только к ЛПС *F. tularensis* [1]. Невозможность получения достаточно большой выборки сывороток людей, переболевших туляремией, побудило нас разработать методологию более углубленного изучения выявленного феномена на лабораторных животных.

Нами были проведены эксперименты по моделированию вакцинного и инфекционного процессов на мышах, морских свинках и крысах с учетом их чувствительности к туляремии.

Цель исследований — изучение особенностей гуморального иммунного ответа при экспериментальной туляремии на лабораторных животных с разной чувствительностью к инфекции.

Материалы и методы

Штаммы. Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica* и вирулентные штаммы *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*; *F. tularensis* А-678 и 120 subsp. *mediasiatica*; *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦПМБ, п. Оболенск, Московская область). Культуры *F. tularensis* выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде FT-агар с черным альбумином (производство ФБУН ГНЦПМБ). Стандартные суспензии клеток туляремийного микроба готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России).

Животные. В экспериментах с животными были использованы мыши инбредной линии BALB/c(H2d) (6–8 недель, масса 18–20 г), крысы Wistar (5–7 недель, вес 200–220 г) и морские свинки (5–7 недель, вес 350–450 г). Животные получены из филиала института биоорганической химии питомника «Пушино» и филиала «Андреевка» ФГБУ Научный центр биомедицинских технологий РАН. Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации и ветеринарным протоколом ВП-2017/6, утвержденным Комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ. Эксперименты и эвтаназию животных осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Получение образцов сывороток от лабораторных животных. Экспериментальные животные были иммунизированы вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и/или инфицированы штаммами *F. tularensis* разных подвидов: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*. У мышей кровь получали из ретроорбитального синуса, от морских свинок кровь отбирали из краевой ушной вены, а при тотальном заборе крови морскую свинку подвергали анестезии и проводили забор крови из сердца. У крыс забор крови проводили из сердца после предварительной анестезии.

Методы выделения ЛПС. Выделение ЛПС из штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. novicida* Utah 112 проводили методом экстракции по Westphal [1965] [20]. Для экстракции бактериальные клетки прогревали при температуре 68°C в 45%-ном водном растворе фенола. После охлаждения, для разделения фаз, смесь центрифугировали. В водной фазе содержались водорастворимые компоненты — нуклеиновые кислоты, полисахариды и гидрофильные молекулы ЛПС, в фенольной фазе содержалась большая часть белков. Нерастворимый материал находился в интерфазе. Водный раствор, содержащий ЛПС, осторожно отбирали и диализовали против дистиллированной воды в течение 4 суток, контролируя процесс диализа определением изменения значения оптической плотности раствора при длине волны 260 нм [21]. Дальнейшие этапы очистки включали в себя последовательную обработку ферментами ДНК-азой, РНК-азой, протеиназой К, 3-кратное ультрацентрифугирование при 100 000g. Чистоту полученных препаратов ЛПС контролировали, определяя содержание белков при электрофоретическом разделении молекул ЛПС в ПААГ окрашиванием Кумасси, содержание нуклеиновых кислот — в агарозном геле окрашиванием бромистым этидием.

Дот-блот. На нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Швеция) точно наносили препараты очищенных ЛПС в количестве 5 мкг. После высыхания мембрану инкубировали в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащем 5% обезжиренного молока (Bio-Rad, США) в течение 40 мин при 37°C. После этого мембраны инкубировали 1 ч при 37°C с исследуемыми сыворотками в разведении 1:100. После этапа отмывки ФСБ (трижды по 5 мин) мембраны инкубировали 40 мин при 37°C в растворе рабочего разведения козьих антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США) (0,1 мл/лунка); козьих антител к IgG крысы, конъюгированных с пероксидазой хрена (Biomedical, Франция) и кроличьих антител к IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). После отмывки (трижды по 5 мин) мембрану помещали в раствор субстрата (0,05% диаминобензидина, 0,015% перекиси водорода, 0,01 М ФСБ (pH 7,4). Результаты регистрировали через 5–10 мин, останавливая реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Иммуноферментный анализ [4]. Планшеты для проведения анализа (Nunc, MaxiSorp, Дания) в течение ночи при температуре 4°C сенсibilизировали раствором антигена ЛПС Ft (5 мкг/мл — 0,1 мл/лунка) в 0,01 М натрий-карбонатном буфере (pH 9,6). Планшет промывали однократно в растворе фосфат-

но-солевого буфера с твин-20 (ФСБ-Т) (0,2 мл/лунка) с использованием автоматической системы отмывки «Проплан» (Пикон, Россия). Дальнейшие процедуры инкубации планшета с реагентами проводили при температуре 37°C на ротационном шейкере при 150 об./мин. Для блокирования участков неспецифической сорбции в лунки планшета вносили раствор 5% обезжиренного молока в ФСБ и инкубировали в течение часа. После трехкратной промывки ФСБ-Т планшет инкубировали 1 ч с сыворотками крови в объеме 0,1 мл/лунка и в разведении 1:50 с двухкратным шагом титрования. Каждый образец пулированных по группам сывороток вносили в двух повторах. Отмытый планшет инкубировали в течение 30 мин в растворе рабочего разведения козьих антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США) (0,1 мл/лунка); козьих антител к IgG крысы, конъюгированных с пероксидазой хрена (Biomedical, Франция) и кроличьих антител к IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). После четырехкратной отмывки ФСБ-Т в лунки планшета добавляли по 0,1 мл свежеприготовленного раствора субстрата (0,2 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, 0,03% перекиси водорода). Ферментативную реакцию останавливали после развития окраски (через 15 мин) добавлением в лунки планшета 0,05 мл 0,1 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм с помощью планшетного фотометра «Униплан» (Пикон, Россия).

Статистический анализ. Для статистического анализа результатов использовали общепринятые методы статистической обработки данных, а также программы Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Результаты представлены как средняя величина ± стандартное отклонение. Уровни значимости (p) для вероятности 95% были определены с использованием критерия Стьюдента t с помощью статистических программ, встроенных в программу Windows Excel. Стандартные отклонения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Мышей линии BALB/c и морских свинок, как очень чувствительных и восприимчивых к возбудителю туляремии животных (LD_{50} для вирулентных штаммов составляет единичные клетки), предварительно однократно подкожно иммунизировали вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ — мышей в дозе 30 м.к., морских свинок в дозе 500 м.к., после чего заражали подкожно вирулентными штаммами *F. tularensis* 503, *F. tularensis* A-678 и 120,

F. tularensis Schu в дозе 1000 DCL. Крыс линии Wistar инфицировали теми же вирулентными штаммами как после предварительной вакцинации, так и без нее.

Количество образцов сывороток лабораторных животных, полученных в ходе проведения экспериментов по иммунизации и инфицированию для проведения серодиагностических исследований, представлено в таблице 1.

Для изучения иммунного процесса у мышей линии BALB/с и морских свинок, которых иммунизировали однократно подкожно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, изучали динамику появления двух видов иммуногло-

Таблица 1. Количество образцов сывороток, полученных от лабораторных животных после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и инфицированных штаммами *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*

Table 1. Number of serum samples obtained from laboratory animals after immunization with vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG and infected with *F. tularensis* strains of subspecies *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*

Вид лабораторных животных Species of laboratory animals	Обработка животных Type of manipulation	Количество образцов сыворотки Amount of serum samples
Мыши Mice	иммунизация immunization	150
	последующее инфицирование штаммами разных подвидов subsequent infection with strains of different subspecies	150
	интактные intact	30
Морские свинки Guinea pigs	иммунизация immunization	40
	последующее инфицирование штаммами разных подвидов subsequent infection with strains of different subspecies	30
	интактные intact	10
Крысы Rats	иммунизация immunization	30
	инфицирование штаммами разных подвидов infection with strains of different subspecies	60

булинов с различной антигенной специфичностью к эпитопам ЛПС Ft и ЛПС Fn методами ИФА и дот-блота.

Титр антител к ЛПС Ft определяли методом ИФА на 30, 60, 90, 120, 150, 180 сутки после иммунизации. Данные реципрокных титров к ЛПС Ft в сыворотках мышей и морских свинок приведены на рисунке 1.

Представленные данные свидетельствуют, что титры специфических туляреминых антител в сыворотках вакцинированных мышей и морских свинок нарастают и сохраняются до 150 суток, после чего начинают снижаться; при этом следует отметить, что у морских свинок он в среднем в 5 раз выше, чем у мышей.

Методом дот-блота антитела к ЛПС Fn в сыворотках мышей линии BALB/с и морских свинок, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обнаружить не удалось, что согласуется с данными Ароновой (2005) [1].

Для изучения гуморального иммунитета при инфекционном процессе мыши через 60 суток после вакцинации, а морские свинки через 90 суток были заражены вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* A-678 (subsp. *mediasiatica*) и *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*) в дозе 1000 DCL (1000 м.к.) на мышью и морскую свинку (по 5 животных в группе).

У мышей после заражения наблюдали падение веса, что является показателем физиологического состояния животных и может служить одним из критериев развития инфекционного процесса, однако гибели животных в течение периода наблюдения не отмечали. У морских свинок, зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*) и *F. tularensis* A-678 (subsp. *mediasiatica*), также наблюдали потерю веса, снижение аппетита, понижение активности, у отдельных животных наблюдали увеличение паховых лимфоузлов. Наблюдение за инфицированными животными вели до 28 дня, к этому сроку наблюдали восстановление веса и нормализацию всех поведенческих реакций. У морских свинок, зараженных вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*), наблюдали падение веса с 3–4 суток после инфицирования, к 14 дню наблюдений они все погибли. Таким образом, для дальнейшего исследования нами было получено по 5 сывороток мышей после заражения вирулентными штаммами всех подвидов и по 5 сывороток морских свинок после заражения вирулентными штаммами 503 и A-678. Специфические антитела определяли методом ИФА с ЛПС Ft и дот-блотом с ЛПС Ft и ЛПС Fn (табл. 2).

Титр специфических антител к ЛПС Ft после заражения вирулентными штаммами в мышинных сыворотках увеличивался по сравнению

с вакцинальным незначительно — в 2–8 раз (рис. 1, табл. 2). У морских свинок повышение титра антител после заражения было более выявлено (до 40 раз) (рис. 1, табл. 2).

Оценка специфических взаимодействий с ЛПС Ft и ЛПС Fn методом дот-блота выявила интересную закономерность: с ЛПС Ft хорошо реагировали как сыворотки инфицированных мышей, так и сыворотки инфицированных морских свинок. В отличие от этого, ЛПС Fn распознавался только иммунными сыворотками переболевших морских свинок, тогда как реакции связывания ЛПС Fn с иммуноглобулинами сывороток мышей не наблюдалось (табл. 2).

Крысы, как и человек, являются высоковосприимчивыми, но малочувствительными к туляремии, поэтому инфекционный процесс мы изучали как на иммунных, так и на невакцинированных животных. Для изучения поствакцинального иммунитета крыс линии Wistar (в количестве 5 шт.) иммунизировали в дозе 1000 м.к./крысу вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Постинфекционный иммунитет исследовали при заражении крыс природными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), A-678 (subsp. *mediasiatica*) и Schu (subsp. *tularensis*) дозами 100, 1000 и 10 000 м.к./крысу (по 3 животных в группе) как с предварительной вакцинацией (104 м.к./крысу, по 3 животных в группе), так и без иммунизации.

На 28 сутки оценивали титр антител к ЛПС Ft методом ИФА (рис. 2), оценку специфичности взаимодействий с ЛПС Ft и ЛПС Fn проводили

методом дот-блота (табл. 3). При вакцинации крыс титры антител не превышали значений 1:1000, антитела к ЛПС Fn выявлялись только у животных, инфицированных вирулентными штаммами, наибольшее повышение титра антител при заражении вызвал штамм Schu (subsp. *tularensis*) (рис. 2).

Примечательно, что при заражении вирулентными штаммами без предварительной вакцинации наиболее низкая инфицирующая доза вызывала наибольшее нарастание титра антител независимо от подвида заражающего штамма. Вероятно, острый инфекционный процесс вызывает некоторое угнетение процесса антителообразования, которое к моменту отбора крови еще не достигло максимума (рис. 2).

Таким образом, данные, полученные на модели экспериментальной туляремии с использованием лабораторных животных трех видов, свидетельствуют, что у крыс и морских свинок происходит выработка антител, которые связываются как с ЛПС Ft, так и с ЛПС Fn. В случае вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ этих видов животных специфических взаимодействий иммунных сывороток с ЛПС Fn не наблюдали, хотя сыворотки хорошо реагировали с ЛПС Ft.

При проведении экспериментов по вакцинации и по заражению мышей вирулентными штаммами нам не удалось обнаружить специфических взаимодействий мышинных сывороток с ЛПС Fn, хотя они хорошо распознавали ЛПС Ft.



Рисунок 1. Динамика изменения титров специфических антител к ЛПС Ft методом ИФА у лабораторных животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Figure 1. Dynamics of anti-LPS Ft antibody titers in laboratory animals immunized with strain *F. tularensis* 15 NIEG assessed by ELISA

Примечание. На каждом сроке отбора сыворотки каждого вида животных объединяли в одну группу и изучали как один образец.

Note. Sera from each animal species were collected and pooled at each time point after immunization with strain *F. tularensis* 15 NIEG.

Обсуждение

При диагностике туляремии оценка клеточного иммунитета является самым надежным методом специфической диагностики, тем не менее в обычной практической медицине наиболее распространенным остается определение специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотке крови [4, 5, 15, 16, 17]. Традиционно в агглютинационных тестах для серодиагностики используются убитые цельные микробные клетки, однако в последние годы для выявления специфических антител чаще всего используют очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* [6, 10, 15, 16, 17].

Нами проведена оценка целесообразности определения специфичности индуцируемых антител к эпитопам ЛПС Ft и ЛПС Fn у лабо-

раторных животных разной чувствительности к туляремии для оценки инфекционного процесса, вызываемого вирулентными штаммами возбудителя туляремии трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), а также поствакцинального иммунного ответа.

Для этих целей была получена коллекция из более 300 экспериментальных иммунных сывороток лабораторных животных — мышей, морских свинок и крыс, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ с последующим заражением вирулентными штаммами различных подвидов.

Сыворотки животных, зараженных вирулентными штаммами разных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), позволили нам объективно оценить возможность проведения дифференциации инфекционного и вакци-

Таблица 2. Выявление специфических антител к ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft) и ЛПС *F. novicida* (ЛПС Fn) в сыворотках мышей линии BALB/c и морских свинок после заражения вирулентными штаммами разных подвидов

Table 2. Identification of specific antibodies to LPS *F. tularensis* 15 NIEEG (LPS Ft) and LPS *F. novicida* (LPS Fn) in the sera obtained from BALB/c mice and guinea pigs after infection with virulent strains of different subspecies

Вид животного Species of laboratory animals	Заражающий штамм <i>F. tularensis</i> Infectious strain of <i>F. tularensis</i>	Подвид заражающего штамма Subspecies of infectious strain	Определение специфических антител Detection of specific antibodies		
			ИФА с ЛПС Ft ELISA with LPS Ft	Дот-блот с ЛПС Ft Dot-blot with LPS Ft	Дот-блот с ЛПС Fn Dot-blot with LPS Fn
Мыши линии BALB/c BALB/c mice	503	<i>holarctica</i>	1:400	+	–
	503		1:400	+	–
	503		1:400	+	–
	503		1:800	+	–
	503		1:200	+	–
	A-678	<i>mediasiatica</i>	1:800	+	–
	A-678		1:400	+	–
	A-678		1:800	+	–
	A-678		1:800	+	–
	A-678		1:800	+	–
	Schu	<i>tularensis</i>	1:1600	+	–
	Schu		1:800	+	–
	Schu		1:800	+	–
	Schu		1:1600	+	–
	Schu		1:800	+	–
Морские свинки Guinea pigs	503	<i>holarctica</i>	1:102400	+	+
	503		1:12800	+	+
	503		1:51600	+	+
	503		1:51600	+	+
	503		1:51600	+	+
	A-678	<i>mediasiatica</i>	1:6400	+	+
	A-678		1:51600	+	+
	A-678		1:12800	+	+
	A-678		1:6400	+	+
	A-678		1:51600	+	+

нального процессов по спектру специфических антител, связывающихся с ЛПС *F. tularensis* и с ЛПС *F. novicida*. Появление в сыворотках инфицированных животных антител, способных взаимодействовать с ЛПС Fn, может быть обусловлено либо более интенсивным процессом антителообразования, сопровождающего инфекционный процесс, либо выработкой иного, более широкого, спектра специфических антител, которые могут связываться и с молекулой ЛПС *F. novicida*. В экспериментах по перекрестному истощению сывороток, полученных после инфицирования штаммами *F. tularensis* и *F. novicida*, было показано, что в процессе

развития туляремийной инфекции, молекулы ЛПС бактериальной клетки подвергаются антигенной модификации, вследствие чего появляются эпитопы, специфичные не только для ЛПС Ft, но и для ЛПС Fn [1].

Обращают на себя внимание данные, полученные при исследовании сывороток мышей линии BALB/c: у этого вида животных в сыворотках не удалось обнаружить антитела к ЛПС Fn ни после вакцинации, ни после заражения вирулентными штаммами. Считается, что тяжелая форма течения туляремии у мышей линии BALB/c связана с особенностями их иммунной системы [2]. Это вызывает развитие транзитор-

Таблица 3. Дот-блоты сывороток крыс, вакцинированных штаммом 15 НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* голарктического (503), среднеазиатского (A-678 и 120) и неарктического подвидов (Schu), с ЛПС Ft и ЛПС Fn в качестве антигенов

Table 3. Dot-blotting with sera obtained from rats vaccinated with the 15 NIEG strain and infected with virulent strains of *F. tularensis holarctica* (503), *mediasiatica* (A-678 and 120) and *tularensis* subspecies (Schu), recognizing antigens LPS Ft and LPS Fn

<i>F. tularensis</i> , подвид <i>F. tularensis</i> , subspecies	Характеристики Characteristics	<i>F. tularensis</i> , штаммы <i>F. tularensis</i> , strains	Доза заражения, м.к./крысу Dose of infection, CFU/rat	Дот-блоты с антигенами ЛПС Ft и ЛПС Fn Dot-blot with LPS Ft and LPS Fn
<i>holarctica</i>	Вакцинный Vaccine strain	15НИИЭГ NIEG	10 000	
			1000	
	Вирулентный Virulent strain	503	10 000	
1000				
<i>mediasiatica</i>	Вирулентный (Средняя Азия) Virulent (Middle Asia) strain	120	1000	
			10 000	
	Вирулентный (Алтай) Virulent (Altaic) strain	A-678	100	
			1000	
			10 000	
	<i>tularensis</i>	Вирулентный Virulent strain	Schu	100
1000				
10 000				

Примечание. *В нижнем левом углу нанесен ЛПС Fn, в верхнем правом — ЛПС Ft.

Note. *LPS Fn and LPS Ft were placed in the lower left and upper right corner, respectively.

ного иммунодефицита, определяя низкий уровень выработки специфических антител (невысокие значения титров антител к ЛПС Ft). При этом доля тех антител, которые распознают эпитопы на молекуле ЛПС Fn, возможно, находится за порогом чувствительности метода их определения. С другой стороны, не исключено, что особенности иммунной системы мышей не позволяют им реагировать на вирулентные штаммы тем спектром антител, которые присущи морским свинкам и крысам. При этом экспериментальная туляремия у мышей очень часто используется при моделировании инфекционного процесса, хотя очевидно, что иммунный ответ в организме мышей отличается от процессов, происходящих в организме человека.

Тенденция нарастания титра антител для каждого вида животных при заражении вирулентными штаммами имела своеобразный характер. Так, для крыс и мышей при вакцинации были характерны меньшие титры антител, чем для морских свинок. В случае инфицирования иммунных животных вирулентными штаммами наибольшее повышение титра антител мы также наблюдали у морских свинок. Для крыс заражение штаммом Schu (subsp. *tularensis*) после вакцинации вызвало большее повышение титров антител, чем заражение штаммами подвидов *holarctica* и *mediasiatica*.

При заражении крыс вирулентными штаммами без предварительной вакцинации было обнаружено, что наиболее низкая из заражающих доз индуцирует максимальное нарастание

титра антител для всех подвидов *F. tularensis*. Вероятно, что высокая инфицирующая доза, вызывающая у крыс иммуносупрессию, индуцирует более низкую продукцию специфических иммуноглобулинов.

Выводы

1. В модельных экспериментах на лабораторных животных — морских свинках и крысах — был изучен спектр специфических антител, вырабатываемых при инфицировании *F. tularensis*, и достоверно установлена диагностическая значимость использования ЛПС Fn для подтверждения заболевания туляремией. На репрезентативной выборке сывороток лабораторных животных, вакцинированных и инфицированных вирулентными штаммами, удалось подтвердить, что наличие антител к липополисахариду *F. novicida* может служить сигнальным признаком для дифференциации инфекционного и вакцинного процессов у животных.

2. Антитела к ЛПС Fn были обнаружены во всех сыворотках морских свинок и крыс, инфицированных вирулентными штаммами всех трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*). При иммунизации животных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ специфических взаимодействий антител сывороток всех видов животных с данным антигеном не выявили. Следовательно, обнаружение антител к липополисахариду *F. novicida* может служить доказательством инфицирования вирулентными штаммами и яв-

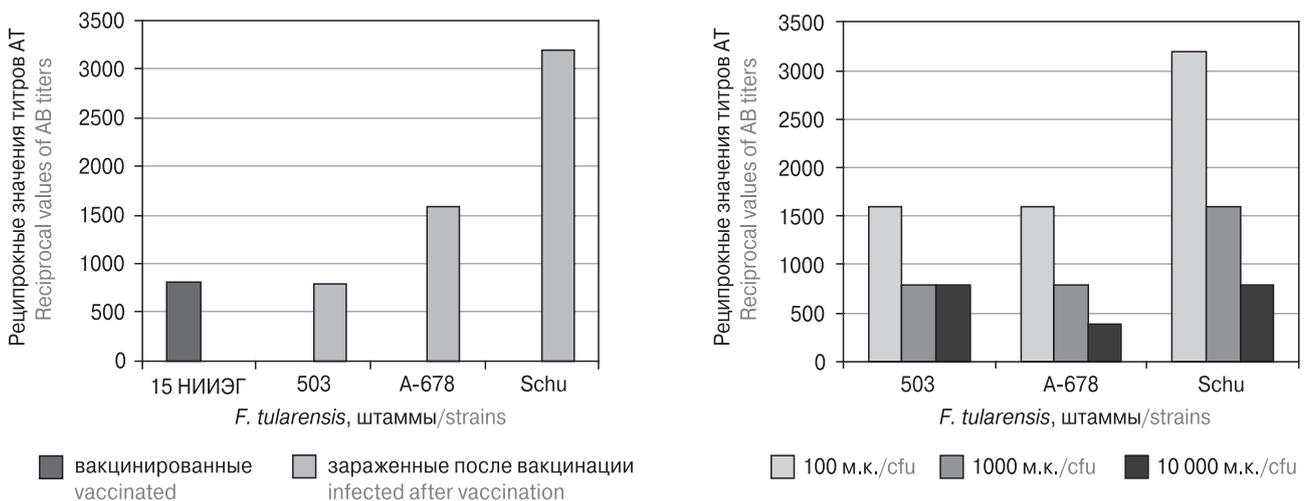


Рисунок 2. Реципрокные значения титров специфических антител к ЛПС Ft, определенные методом ИФА у крыс линии Wistar

Figure 2. Reciprocal values of titres of specific antibodies to LPS Ft, determined by ELISA in Wistar rats

Примечания. А — у крыс, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов в дозе 10^4 м.к.; Б — у крыс, зараженных разными дозами вирулентных штаммов *F. tularensis* разных подвидов без вакцинации. Сыворотки пулировали по группам.

Notes. A — in rats vaccinated and infected with virulent *F. tularensis* strains of different subspecies in a dose of 10^4 CFU; B — in rats infected with different doses virulent *F. tularensis* strains of different subspecies without vaccination. The sera were pooled into groups.

ляться дифференциальным признаком инфекционного и вакцинного процессов.

3. Анализ полученных результатов показывает, что при изучении гуморального звена иммунитета при туляремии важное значение имеет вид используемого лабораторного животного. Наиболее приближенными по иммунному ответу к организму человека, по нашим данным, являются крысы и морские свинки.

4. Полученные нами результаты доказывают перспективность разработки диагностических систем с использованием в качестве дополнительного антигена ЛПС F₉₀, наличие антител к которому позволяет дифференцировать ин-

фекционный и вакцинный процесс при туляремии. Использование таких тестов в экспресс-варианте, к примеру, в виде иммунохроматографических тестов (ИХ-тестов), в широкой эпидемиологической практике может ускорить и улучшить результативность при мониторинге заболеваемости людей и животных туляремией в эндемичных очагах.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы/References

1. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Фазовые вариации липополисахарида возбудителя туляремии при инфекции и иммунизации человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. № 4. С. 8–12. [Aronova N.V., Pavlovich N.V. Phase variations of lipopolysaccharide francisella tularensis in human infection and immunization. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2005, no. 4, pp. 8–12. (In Russ.)]
2. Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Мокриевич А.Н. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. Т. 71, № 4. С. 54–62. [Kombarova T.I., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Borzilov A.I., Korobova O.V., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Mokrievich A.N. Comparative evaluation of reactogenicity tularemia vaccine using of different biomodels. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2013, vol. 71, no. 4, pp. 54–62. doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-6-74-86 (In Russ.)]
3. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. № 1. С. 22–29. [Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Tularemia: relevant issues and forecast of epidemic situation in the territory of the Russian Federation in 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2018, no. 1, pp. 22–29. doi: 10.21055/0370-1069-2018-1-22-29 (In Russ.)]
4. Мещерякова И.С., Умнова Н.Г., Шаханина К.Л., Павлова И.П. Использование иммуноферментного метода ELISA для выявления возбудителя туляремии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988. Т. 65, № 2. С. 109–112. [Meshcheryakova I.S. Umnova N.G., Shakhanina K.L., Pavlova I.P. Using ELISA immunoenzymatic method for detecting the causative agent of tularemia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1988, vol. 65, no. 2, pp. 109–112. (In Russ.)]
5. Anderson R.V., Crane D.D., Bosio C.M. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 40, pp. 6562–6572. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.072
6. Dahlstrand S., Ringertz O., Zetterberg B. Airborne tularemia in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1971, vol. 3, pp. 7–16. doi: 10.3109/inf.1971.3.issue-1.02
7. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 9, pp. 245–249.
8. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of Francisella lipopolysaccharide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 202–218. doi: 10.1196/annals.1409.006
9. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 30–66. doi: 10.1196/annals.1409.011
10. Porsch-Ozcrumez M., Kischel N., Priebe H., Spletstoesser W., Finke E.J., Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, vol. 11, pp. 1008–1015. doi: 10.1128/CDLI.11.6.1008-1015.2004
11. Raetz C.R.H., Guan Z., Ingram B.O., Six D.A., Song F., Wang X. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J. Lipid Res.*, 2009, vol. 50, pp. 103–108. doi: 10.1194/jlr.R800060-JLR200
12. Raetz C.R.H., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, vol. 76, pp. 295–329. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803
13. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, vol. 71, pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
14. Ransmeier J.C., Ewing C.L. The agglutination reaction in tularemia. *J. Infect. Dis.*, 1941, vol. 69, pp. 193–205.
15. Schmitt P., Spletstoesser W., Porsch-Ozcrumez M., Finke E.J., Grunow R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol. Infect.*, 2005, vol. 133, pp. 759–766.
16. Sharma N., Hotta A., Yamamoto Y., Fujita O., Uda A., Morikawa S., Yamada A., Tanabayashi K. Detection of Francisella tularensis-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, vol. 20, pp. 9–16. doi: 10.1128/CVI.00516-12

17. Spletstoesser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of Francisella tularensis-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, pp. 1629–1634. doi: 10.1128/JCM.01475-09
18. Vinogradov E., Perry M.B., Conlan J.W. Structural analysis of Francisella tularensis lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 24, pp. 6112–6118.
19. Vinogradov E.V., Shashkov A.S., Knirel, Y.A. Kochetkov N.K., Tochamysheva N.V., Averin S.F., Goncharova O.V., Khlebnikov V.S. Structure of the O-antigen of Francisella tularensis strain 15. *Carbohydr. Res.*, 1991, vol. 214, pp. 289–297.
20. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 1965, vol. 5, pp. 83–91.
21. Wetmur J.G., Davidson N.J. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.*, 1968, vol. 31, p. 349.

Авторы:

Горбатов А.А., младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Титарева Г.М., к.м.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Комбарова Т.И., к.б.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Шайхутдинова Р.З., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории чумы ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Кравченко Т.Б., к.б.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Миронова Р.И., научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Бахтеева И.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Аронова Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Павлович Н.В., д.м.н., зав. лабораторией туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Мокриевич А.Н., д.м.н., зав. отделом особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Фирстова В.В., д.б.н., зав. лабораторией молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Gorbatov A.A., Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Titareva G.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Kombarova T.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Shaikhutdinova R.Z., PhD (Biology), Senior Researcher, Plague Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Kravchenko T.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Mironova R.I., Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Bakhteeva I.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Aronova N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Tularemia Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Pavlovich N.V., PhD, MD (Medicine), Head of Tularemia Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Mokrievich A.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Firstova V.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.07.2018
Отправлена на доработку 13.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 27.07.2018
Revision received 13.03.2019
Accepted 09.04.2019

COMPARATIVE EFFICACY AND SAFETY OF PREVENTIVE TREATMENT WITH CYTOVIR-3 AND ARBIDOL IN CHILDREN DURING SEASONAL OUTBREAK OF RESPIRATORY VIRAL INFECTION (AN OPEN-LABEL RANDOMIZED CLINICAL STUDY)

V.S. Smirnov^a, S.A. Savelyev^a, S.V. Petlenko^a, G. Redlich^c, M.K. Erofeeva^b,
A.V. Lyovina^a, N.I. Zaviyalova^a

^a JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation

^b Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

^c Implicit Bioscience Ltd, Brisbane, Australia

Abstract. *Aim.* To compare the safety and prophylactic efficacy of Cytovir-3 and Arbidol in an open-label randomized clinical trial in children at seasonal risk of infectious respiratory disease. *Methods.* This study was performed in the period preceding a seasonal outbreak of acute respiratory viral infections (ARVI) and influenza. The study enrolled apparently healthy children aged 6 to 18 years without contra-indications to either Cytovir-3 or Arbidol. Cytovir-3 was given as 1 capsule per day, each day in a fasted state for 12 days. Arbidol was taken as a 100 mg capsule twice a week for three weeks. Following dosing, subjects were followed-up for a further three weeks. Overall health and presence of clinical symptoms of either ARVI or influenza were monitored daily in all subjects. The level of sIgA in saliva was baselined before treatment and measured at the end of the follow-up period. *Results.* Most subjects did not exhibit any change in overall health status during the dosing and follow-up periods. The first two cases of illness in subjects receiving Cytovir-3 were diagnosed at the end of the third week after completion of dosing. In those subjects receiving Arbidol the first cases of illness were reported at the end of the second week following the end of prophylactic dosing. All patients displayed a significant increase in sIgA level at the end of the dosing period, but this was more pronounced in the Cytovir-3 group. *Conclusion.* The results of the open comparative randomized study drugs Cytovir-3 and Arbidol confirmed the safety and tolerability of both medications, and that the prophylactic efficacy of Cytovir-3 is equal to that of Arbidol.

Key words: ARVI, prophylaxis, preventive medication, children, Cytovir-3, Arbidol, sIgA.

ОТКРЫТОЕ СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ «ЦИТОВИР-3» И «АРБИДОЛ» ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ ДЕТЕЙ В ПЕРИОД СЕЗОННОГО ПОДЪЕМА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Смирнов В.С.¹, Савельев С.А.¹, Петленко С.В.¹, Редлих Г.³, Ерофеева М.К.², Левина А.В.¹, Завьялова Н.И.¹

¹АО Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ НИИ группа им. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия

³Implicit Bioscience, Woolloongabba, Brisbane, Australia

Резюме. Цель исследования: открытое сравнительное, рандомизированное исследование профилактической эффективности препаратов Цитовир-3 и Арбидол. *Методы.* Исследование проведено в период, предшествовавший

Адрес для переписки:

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

Contacts:

Vyacheslav S. Smirnov
191023, Russian Federation, St. Petersburg, Muchnoy lane, 19,
JSC MBSPC “Cytomed”.
Phone: +7 (911) 948-59-22 (mobile). E-mail: vssmi@mail.ru

Библиографическое описание:

Смирнов В.С., Савельев С.А., Петленко С.В., Редлих Г., Ерофеева М.К., Левина А.В., Завьялова Н.И. Открытое сравнительное исследование безопасности и эффективности препаратов «Цитовир-3» и «Арбидол» при профилактике детей в период сезонного подъема заболеваемости респираторными вирусными инфекциями // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 273–278. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-273-278

Citation:

Smirnov V.S., Savelyev S.A., Petlenko S.V., Redlich G., Erofeeva M.K., Lyovina A.V., Zaviyalova N.I. Comparative efficacy and safety of preventive treatment with cytovir-3 and arbidol in children during seasonal outbreak of respiratory viral infection (an open-label randomized clinical study) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 273–278. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-273-278

© Smirnov V.S. et al., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-273-278>

сезонной вспышке острых респираторных вирусных инфекций и гриппа. В исследовании принимали участие практически здоровые дети в возрасте от 6 до 18 лет, не имевшие противопоказаний к назначению препаратов Цитовир-3 и Арбидол. Цитовир-3 назначали по 1 капсуле натошак 1 раз в день ежедневно в течение 12 дней. Арбидол применяли по 100 мг 2 раза в неделю в течение 3 недель. По окончании периода профилактики детей наблюдали еще 3 недели. Ежедневно у всех участников выявляли общее состояние и наличие клинических симптомов ОРВИ или гриппа. В начале и в конце срока наблюдения у всех добровольцев определяли уровень sIgA в слюне. **Результаты.** В период проведения профилактического приема препаратов и последующего наблюдения у большинства добровольцев не выявлено каких-либо отклонений в состоянии здоровья. Первые 2 случая заболевания у лиц, получавших Цитовир-3, отмечены в конце 3 недели после профилактического приема препарата. У лиц, получавших Арбидол первые заболевания отмечены в конце 2 недели после окончания курса профилактического приема препарата. В конце периода профилактики у всех добровольцев выявлен достоверный рост уровня sIgA, более выраженный у детей, принимавших Цитовир-3. **Заключение.** Полученные результаты открытого сравнительного рандомизированного исследования безопасности и эффективности препаратов Цитовир-3 и Арбидол, показали, что препарат Цитовир-3 по своей профилактической эффективности, как минимум, не уступает препарату Арбидол.

Ключевые слова: ОРВИ, заболеваемость респираторными инфекциями, профилактика, дети, Цитовир-3, Арбидол, иммуноглобулин А.

Influenza and other acute respiratory viral infections (ARVI) are the most common seasonal epidemic diseases in human populations. According to WHO, influenza viruses result in 250 000 to 500 000 deaths annually. For example, in 2014 least 5 million cases of severe diseases were recorded [1].

Official statistics for the Russian Federation show that between 0.9 and 3.5 million cases of influenza are registered yearly, resulting in 20 000 to 53 000 deaths.

Children are considered to be most at risk, particularly those who spend most of their time in crowded group spaces such as kindergartens, schools, boarding schools, cadet corps etc. The development of safe and effective drug interventions to reduce the impact of respiratory viral pathogens in such groups of children that are often in close body contact is of great practical importance. Interventions intended to prevent influenza and ARVI may be grouped into one of three main categories: (i) pathogen-specific, prophylactic interventions (e.g. vaccines), (ii) disease-specific antiviral drugs, or (iii) non-specific, host-directed interventions (e.g. interferons, inducers of endogenous interferon synthesis, immunotropic therapy, multivitamin and mineral preparations, antioxidants etc.).

There are a number of influenza vaccines available in the Russian Federation, Grippol being the most widely used [2]. Among the antiviral drugs, the M2 channel inhibitors (amantadin, remantadin) [3] and neuraminidase inhibitors (oseltamivir, zanamivir) [4] are the most common. The latter two are recognized by the WHO as a standard therapy for influenza [5].

Non-specific, host-directed drugs to treat and prevent influenza and ARVI include numerous interferon-based drugs, derivatives of acridonacetic acid and symptomatic medications (quick-relief medication) [6]. This class includes the two drugs compared in this study: Cytovir-3 and Arbidol. Cytovir-3 is a mixture of ascorbic acid, bendazol and the dipeptide Glutamyl-Tryptophan in a form of a sodium salt [6]. Arbidol (umifenovir) is recognized as a drug with direct antiviral as well as immunotherapeutic properties and is used for prevention and treatment of influenza and ARVI. For non-specific prevention during influenza

and ARVI outbreaks this drug is prescribed for children aged 6 to 12 years as 100 mg and for children over 12 year and for adults as 200 mg twice a week over three weeks of treatment [7].

Cytovir-3 is widely used for prevention and early treatment of influenza and other ARVI in children and adults [6, 8]. Initially this drug was dosed with the same regimen for both prophylactic and therapeutic use (one capsule three times a day, over four consecutive days) [6]. However the concept of "prevention" was later sub-categorized to separate the use for routine or seasonal prevention from that where urgent prevention was required. The former aims to support background capacity in the innate immune response to an epidemic rise in morbidity whereas the latter is preferred in a situation where the subject has current contact with persons who are definitely unwell, but not yet specifically symptomatic for ARVI or influenza. From this perspective, it is logical to assume that these two regimens should differ both in duration and dosing of Cytovir-3. The regimen for urgent prevention has remained unchanged, but routine seasonal prevention is now dosed at one capsule per day, in a fasting state, for 12 consecutive days.

The current study was devoted to investigation of the preventive efficacy of this prolonged regimen for routine prevention. The main goal was to assess the preventive efficacy of a prolonged regimen of Cytovir-3 compared to standard regimen of Arbidol in children during a seasonal outbreak of influenza and ARVI. This clinical trial was prospective and performed as open-label randomized comparative parallel study of efficacy and safety of Cytovir-3 (capsules) and Arbidol (capsules 100 mg) as routine prophylaxis of influenza and ARVI in children in pre-school and secondary school organizations.

Materials and methods

The current study enrolled 207 healthy children aged 6 to 18 years (boys: 119 or 57.4%; girls: 88 or 42.63%) attending childcare facilities in pre-schools or secondary schools and who matched the inclusion criteria. Two commercially available drugs with proven

efficacy in the treatment and prevention of influenza and ARVI were used: Cytovir-3 capsules (Cytomed Oy, Lappeenranta, Finland) and Arbidol capsules 100 mg (JSC Pharmstandard-Leksredstva, Kursk, Russian Federation) [6, 11].

Study recruitment was voluntary. Before randomization to a treatment group, written informed consent was obtained from a subject's parents or adoptive parents or other legal representative. Additional written informed consent was obtained from all subjects over the age of 14 years. Racial and ethnic differences were disregarded. 102 children were randomized to receive Cytovir-3 and 105 children were randomized to receive Arbidol. Both legislation of the Russian Federation and the Declaration of Helsinki (rev.7, 2013) declare the use of placebo controls illegal and unethical in such clinical trials. Mean age of children included into the trial was 8.2 years (8.7 in the Cytovir-3 group and 7.6 in the Arbidol group, $p > 0.1$). Neither gender differences nor structure of anamnestic morbidity were statistically significant ($p = 0.46-1.0$). Inclusion criteria were: boys and girls aged from 6 to 18 years without any signs of infection or intoxication, with a verified diagnosis "free of disease" (according to the decision of Ministry of Health No. 621 dd 30.12.2003 classified as health group I or II), not having taken antibiotic, antiviral, hormonal or immunotropic drugs during the previous two months and not being vaccinated against influenza during the 12 preceding months. Teenage girls were required to have negative pregnancy test.

Exclusion criteria were: lack of tolerability of investigated drugs (or their separate compounds), having contacts with ARVI patients during preceding 14 days, participation in any other clinical trial during preceding 30 days. Children of staff of either research center or a sponsor company were excluded from the trial.

Cytovir-3 was prescribed to children included in the experimental group as follows: 1 capsule taken 30 minutes before a meal once per day for 12 consecutive days; Arbidol was prescribed to children included in the comparison group as follows: 1 capsule (100 mg) twice a week for three weeks. Since the dosing duration for each of the two drugs was different, the study duration was different for each group. Inclusive of the 3-week follow-up, the Cytovir-3 group took from 33 to 35 days to complete the study and the Arbidol group took from 39 to 42 days to do so.

During the entire period of observation, children were examined daily and their general health status as well as skin, mucosa, peripheral lymph nodes was noted. Any apparent illness was assessed for conformity to ARVI symptoms. In addition, all study participants were checked daily for the presence of adverse events and lack of drug tolerability. Body temperature, heart rate, blood pressure and breathing rate were assessed on days 1, 3, 5, 7, 9 and 11 in the Cytovir-3 group and on days 1, 4, 8, 11, 15 and 18 in the Arbidol group.

On the first and last days of taking Cytovir-3 and Arbidol (day 12 and 18, respectively) the level of secretory immunoglobulin A (sIgA) was assessed. For this purpose saliva samples were taken from all partici-

pants and placed into the Sali Caps containers (IBL International, Italy) made of extra pure polypropylene (absorptive capacity less than 5%) and equipped with a tubule preventing contact of saliva with skin and labial mucosa. The sIgA determination was performed by means of quantitative ELISA method using a StatFax 2100 analyzer (Becton Dickinson, USA) with a wavelength 450 and 620 nm and commercial kits (Dia Metra, Germany) in accordance with protocols of the manufacturer. The measured range was 0.5–400 $\mu\text{g/mL}$, method sensitivity — 0.5 $\mu\text{g/mL}$. All data were entered on individual case report forms.

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 22.0. (Armonk, NY: IBM Corp.). The between-group comparisons were assessed using paired and unpaired t-test for normally distributed data (Lilliefors test). For the data failed normality test a pairwise Wilcoxon signed-rank test (for dependent samples) and Mann–Whitney U test (for independent samples) were used. Differences between groups were considered as significant if $p \leq 0.05$. Anamnestic morbidity was assessed using a chi-square test. In some cases Yates's correction for continuity and Fisher's exact test were used [9]. Data were expressed as $M \pm SE$.

Results

The initial health status of all participants was estimated as normal. Arterial blood pressure was $108.3 \pm 7.8/67.2 \pm 5.0$ mm Hg in the Cytovir-3 group and $104.6 \pm 9.8/65.6 \pm 5.7$ mm Hg in the Arbidol group. There were no significant differences in heart rate between Cytovir-3 and Arbidol groups (81.9 ± 6.0 and 81.7 ± 7.8 , respectively) and body temperature ($36.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and $36.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$, respectively). Prior medical histories of ARVI (100% in both groups), chicken pox (26.0% and 29.8%, respectively, $p = 0.54$), tonsillitis (7.7% and 5.8% respectively, $p = 0.54$) and acute bronchitis (7.7% and 8.6% respectively, $p = 0.8$) were the most common. Other diseases (otitis, adenoiditis, scarlet fever, pneumonia etc.) were sporadic. Regardless the etiology, all reported diseases had fully resolved no later than two months prior to enrolment in this clinical trial.

Before the trial all participants underwent a determination of salivary sIgA, the level of which was 60.35 ± 15.1 mg/ml in the Cytovir-3 group and 66.83 ± 22.5 mg/ml in the Arbidol group.

During the period of treatment no cases of ARVI were reported despite overall increased level of respiratory illness among the general pediatric population. During follow-up period 9 children were diagnosed with ARVI (tabl. 1).

As noted in table 1, the number of cases among children who received Cytovir-3 was 3,5 times less than among those who received Arbidol. This is an evidence of a consistent trend towards a lower morbidity in the Cytovir-3 group.

An analysis of the morbidity rate (qualitative indicators [10]) did not reveal any significant differences ($d = 5.6$; $\Delta = 6.7 - 1.9 = 4.8$; $5.6 > 4.74$). The same re-

Table 1. ARVI incidence rate in children during follow-up period

Groups	Parameters of ARVI morbidity		Significance of differences
	Number of cases	ARVI affected, %	
Cytovir-3 group (n = 102)	2	1.9	0.1
Arbidol group (n = 105)	7	6.7	

sults were obtained when Fisher's exact test was used [9], showing that the true value of differences in the proportions of positive diagnosis is between -0.5 and 10.5 . Since the calculated confidence limit includes the zero in expression $p = 0.05$, it is possible to conclude that the resulting differences in the respiratory morbidity rates between groups are not statistically significant. That is to say, in terms of preventive treatment both drugs are equally effective.

The analysis of efficacy of preventive treatment in each group included calculation of the relative morbidity rate (RMR), which was found to be 0.0196 ($2/102$) in the Cytovir-3 group and 0.066 ($7/105$) in the Arbidol group. It follows that the percentage of protected people in each group is $1 - \text{RMR}$ or $1 - 0.0196 = 0.980$ for the Cytovir-3 group and $1 - 0.066 = 0.934$ for the Arbidol group. Thus protection index is calculated as $0.980/0.934 = 1.049$, i.e. Cytovir-3 protected children 1.049 times better than Arbidol. This result reflects the prophylactic ability of these two drugs.

Another perspective on preventive efficacy is the period of retention of accumulated protection from disease, defined as the duration from the onset of treatment to the first clinical symptoms and its dynamics in study participants who became sick (tbl. 2).

These data show that no subject in either treatment arm was diagnosed with ARVI or influenza during the respective dosing periods. Moreover there were no incidences of illness during first week of observation period after dosing. However during the second week, signs of respiratory disease were reported in three participants from the Arbidol group but none in the Cytovir-3 group. During the third and final week, in the Arbidol group four subjects had a positive diagnosis but only two were diagnosed in the Cytovir-3 group. These results suggest that the duration of protection is three weeks for Cytovir-3 but only two weeks for Arbidol. Given the small sample size (slightly more than 100 subjects in each group) these results are still preliminary and further investigation is needed.

Besides epidemiological parameters (tables 1 and 2), salivary sIgA titres were assessed before and after dosing in each group, i.e. on day 12 in the Cytovir-3 group and on day 18 in the Arbidol group (tbl. 3).

The sIgA is the most active part of local immune response of mucosa, which is an entry point for various

infections. The salivary sIgA reflects the preventive efficacy of antiviral drugs taken by the host. The current results suggest that baseline levels of sIgA in each group were similar to each other and there were no significant intergroup differences. After dosing, a marked increase of sIgA was revealed suggesting a significant rise of local immunity in mucosa. Intergroup differences in this case were not statistically significant ($p > 0.05$). It is worth mentioning that a slightly increased baseline sIgA level was observed in the Arbidol group when compared with the Cytovir-3 group. However after dosing with Arbidol, sIgA levels were lower than those in children receiving Cytovir-3. For example sIgA titres increased by 1.28 fold in the Arbidol group and 1.46 fold in the Cytovir-3 group. The greater augmentation of sIgA titres in the Cytovir-3 group may suggest a higher preventive efficacy of Cytovir-3.

Discussion

ARVI prophylaxis continues to be a real problem for public health, despite significant progress in the development of antiviral therapy. For a preventive treatment of ARVI and influenza to be effective, it should at least significantly minimize the incidence and severity of complications, if not actually result in the termination of an epidemic. Initially great hope was placed on wider application of preventive vaccination. However this approach is effective only when vaccination coverage reaches 70%, a goal that is achievable only in a limited number of highly organized groups, for example military units [11]. According to epidemiological studies, normal vaccination coverage reaches only 20–30% of the population [12].

One solution to this problem is the use of effective prophylactic drugs to reduce the spread of 'flu and other ARVI, especially in cases where vaccination is undesirable and/or impractical [13]. Arbidol is used quite widely in the Russian Federation [7]. According to Shumilov and co-authors (2002) Arbidol's preventive efficiency is 25% and its therapeutic efficacy is 1.33 [11]. The authors believe that Arbidol reduces the number of ARVI cases, diminishes duration of fever and decreases severity of intoxication and respiratory tract destruction. Another drug for prevention and treatment influenza and ARVI is Cytovir-3. This drug

Table 2. ARVI and influenza incidence rate in children during entire clinical trial

Study group	Number of affected children with influenza and ARVI (n/%)				
	Onset	During dosing	During follow-up period		
			Week 1	Week 2	Week 3
Cytovir-3	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1.6*
Arbidol	0/0	0/0	0/0	3/2.9	4/3.8

Notes. n — number of children; * — children got sick in the last 2 days of the third week.

Table 3. Changes in sIgA titres before and after dosing with investigated drugs

Study Group	sIgA concentration, mcg/ml		Increment ratio, sIgA
	Before dosing	After dosing	
Cytovir-3 (n = 102)	60.40±1.47	88.63±2.11*	1.47
Arbidol (n = 105)	66.84±2.17	85.74±2.36*	1.28

Note. *Significant differences as compared to data before dosing ($p < 0.002$).

is a pharmaceutical composition consisting of ascorbic acid, bendazole and glutamyl-tryptophan at a ratio of 50:20:0.5 [14]. There is evidence that Cytovir-3 is an effective mean of urgent prevention (1 single dose 3 times a day during 4 days) and decreases ARVI and influenza morbidity by 1.96–4.91 fold [6]. This example relates to cases when contact between the pathogens and the susceptible host has already occurred, but the clinical infection is yet to manifest. However the other type of prevention therapy, namely routine or scheduled prevention, is no less important. Routine prevention takes place in the period preceding seasonal or epidemic outbreaks of influenza and other ARVI. This kind of prevention aims to reduce disease incidence (including through implicit seroconversion) and to create a virtual immunity, likely due to latent viruses failing to manifest clinically [15].

This study investigated the efficacy of such an approach. It was performed in healthy children during the period preceding a seasonal outbreak of ARVI. The primary endpoint was comparison of the efficacy of two widely-used drugs — Arbidol and Cytovir-3. We hypothesized that increasing the duration of the preventive dosing regimen of Cytovir-3 from 4 to 12 days while simultaneously reducing daily dose from 3 to 1 capsule would achieve the desired preventive efficacy in this population.

The results show that comparable courses of Cytovir-3 and Arbidol in this setting were completely safe and well tolerated. During the dosing periods, no ARVI incidence was reported in either group, and during the follow-up period only sporadic incidences of illness were noted. Among children receiving Cytovir-3 two such cases (1.6%) were reported in the last two days of the third week of follow-up (tabl. 3). The morbidity in children receiving Arbidol was slightly higher — 7 (6.7%), moreover the first three cases of illness in the Arbidol group were reported as early as the second week of follow-up. At a first glance this difference seems to be significant, however statistical analysis did not reveal significance between comparative groups, probably due to the small sample size. Nevertheless it could be argued that the duration

of preventive efficacy of Arbidol is about two weeks whereas with Cytovir-3 it is up to three weeks even with a 3-fold reduction of the normal daily dose. This reduced dosing regimen for Cytovir-3 is comparable to the standard preventive and therapeutic regimen for Arbidol.

One important factor in resistance to viral infection is the level of sIgA in saliva, a biomarker of innate immunity. More than 75% of all infections including myxoviruses enter our body through the mucous membranes [16]. Therefore it is important to measure sIgA levels during preventive treatment to understand the resilience of mucosal immunity. The study shows that dosing of Cytovir-3 induces a significant increase of sIgA titres in saliva (1.47 fold on average). The same effect was noted during Arbidol dosing, but to a lesser extent — only 1.28 fold. And while sIgA levels at the end of dosing were not statistically different between the groups, baseline sIgA levels in subjects randomized to receive Arbidol were higher than in those subjects who received Cytovir-3. This suggests a trend towards more active enhancement of innate immunity level in the mucosa of children receiving Cytovir-3 which supports the observation that subjects received Cytovir-3 had longer protection than those who received Arbidol (tabl. 2).

Conclusion

In this setting of routine seasonal prophylaxis of ARVI and influenza among infants in close-contact groups, the majority of investigated parameters were not statistically different between subjects receiving either Cytovir-3 or Arbidol. This supports the conclusion that the preventive efficacy of Cytovir-3 is comparable to that of Arbidol. In some cases Cytovir-3 displayed a more pronounced, though not statistically significant, efficacy.

Further studies using larger sample sizes are needed to confirm in greater detail the preventive efficacy of these drugs, but these results suggest that, despite both investigated drugs being equal in terms of preventive efficacy, Cytovir-3 is slightly more effective.

Список литературы/References

1. Ельшина Г.А., Харит С.М., Романенко В.В., Комлева С.В., Пучкова Н.Г., Чирун Н.В., Абрамова М.А., Лонская Н.И., Горбунов М.А. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественных субъединичных адъювантных пандемических моновакцин группы гриппол® у детей от 6 месяцев до 17 лет // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 2 (57). С. 41–46. [Yelshina G.A., Kharit S.M., Romanenko V.V., Komleva S.V., Puchkova N.G., Chirun N.V., Abramova M.A., Lonskaya N.I., Gorbunov M.A. Results of the study of safety and immunogenicity of domestic subjective adjuvant pandemic monopuchin group of grippol® in children from 6 months to 17 years. *Epidemiologiya i vaksinoofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2011, no. 2 (57), pp. 41–46. (In Russ.)]

2. Кузьменко Л.Г., Котлуков В.К., Антипова Н.В. Современные возможности применения комбинированных препаратов для лечения острых респираторных инфекций у детей // Педиатрия. 2013. Т. 92, № 4. С. 71–76. [Kuzmenko L.G., Kotlukov V.K., Antipova N.V. Modern possibilities of application of combined preparations for treatment of acute respiratory infections in children. *Pediatriya = Pediatrics*, 2013, vol. 92, no. 4, pp. 71–76. (In Russ.)]
3. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1968. 207 с. [Sepetliev D. Statistical methods in scientific medical research. *Moscow: Medicine*, 1968. 207 p. (In Russ.)]
4. Смирнов В.С. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. СПб.: ФАРМиндекс, 2008. 50 с. [Smirnov V.S. Prevention and treatment of influenza and acute respiratory viral infections. *St. Petersburg: PHARMindex*, 2008. 50 p. (In Russ.)]
5. Смирнов В.С., Куликов С.В., Власов В.Ю. Фармацевтическая композиция для лечения вирусных заболеваний. Патент № 2155254, 2001. [Smirnov V.S., Kulikov S.V., Vlasov V.Yu. Pharmaceutical composition for the treatment of viral diseases. Patent No. 2155254, 2001]
6. Смирнов В.С., Селиванов А.А. Биорегуляторы а профилактике и лечении гриппа. СПб.: Наука, 1996. 69 с. [Smirnov V.S., Selivanov A.A. Bioregulators and prevention and treatment of influenza. *St. Petersburg: Nauka*, 1996. 69 p. (In Russ.)]
7. Шумилов В.И., Шустер А.М., Лобастов С.П., Шевцов В.А., Медников Б.Л., Пилавский С.А., Литус В.И. Эффективность арбидола в профилактике и лечении острых респираторных вирусных инфекций у военнослужащих // Военно-медицинский журнал. 2002. Т. 323, № 9. С. 51–53. [Shumilov V.I., Shuster A.M., Lobastov S.P., Shevtsov V.A., Mednikov B.L., Pilavskii S.A., Litus V.I. Efficacy of arbidol in prophylaxis and treatment of acute respiratory viral infections in servicemen. *Voenno-meditsinskiy zhurnal = Military Medical Journal*, 2002, vol. 323, no. 9, pp. 51–53. (In Russ.)]
8. Alves Galvão M.G., Rocha Crispino Santos M.A., Alves da Cunha A.J. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2014, iss. 11: CD002745. doi: 10.1002/14651858.CD002745.pub4
9. Bergmeier L.A., Wang Y., Lehner T. The role of immunity in protection from mucosal SIV infection in macaques. *Oral Dis.*, 2002, vol. 8, suppl. 2, pp. 63–68.
10. Blaising J., Polyak S.J., Pécheur E.I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res.*, 2014, vol. 107, pp. 84–94. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.04.006
11. De Clercq E., Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2016, vol. 29, pp. 695–747. doi:10.1128/CMR.00102-15.
12. Doll M.K., Winters N., Boikos C., Kraicer-Melamed H., Gore G., Quach C. Safety and effectiveness of neuraminidase inhibitors for influenza treatment, prophylaxis, and outbreak control: a systematic review of systematic reviews and/or meta-analyses. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017, vol. 72, no. 11, pp. 2990–3007. doi: 10.1093/jac/dkx271
13. Executive summary of the 6th meeting of the WHO Expert Working Group of the GISRS for Surveillance of Antiviral Susceptibility. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2017, vol. 92, no. 41, pp. 611–612.
14. Fisher R.A. Statistical methods for research workers. 14th edition. *Edinburgh: Oliver&Boyd*, 1970. 362 p.
15. Jiménez-García R., Hernandez-Barrera V., Rodríguez-Rieiro C., Carrasco Garrido P., López de Andres A., Jimenez-Trujillo I., Esteban-Vasallo M.D., Domínguez-Berjón M.F., Miguel-Diez J., Astray-Mochales J. Comparison of self-report influenzavaccination coverage with data from a population based computerized vaccination registry and factors associated with discordance. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 35, pp. 4386–4392. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.074
16. Rainwater-Lovett K., Chun K., Lessler J. Influenza outbreak control practices and the effectiveness of interventions in long-term care facilities: a systematic review. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 74–82. doi:10.1111/irv.12203

Авторы:

Смирнов В.С., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Савельев С.А., к.б.н., сотрудник отдела регистрации АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Петленко С.В., д.м.н., начальник клинического отдела АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Редлих Г., генеральный и исполнительный директор компании «Имплицит Биосайнс», Брисбен, Австралия;
Ерофеева М.К., д.м.н., зав. лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Левина А.В., сотрудник отдела клинических исследований АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Завьялова Н.И., сотрудник отдела клинических исследований АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Smirnov V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation;
Savelyev S.A., PhD (Biology), Officer of the Registration Department, JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation;
Petlenko S.V., PhD, MD (Medicine), Head of Clinical Department, JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation;
Redlich G., Chief Executive Officer & Managing Director, “Implicit Bioscience Ltd”, Brisbane, Australia;
Erofeeva M.K., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory for Testing New Means for Protection Against Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Lyovina A.V., Officer of Clinical Department of JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation;
Zaviyalova N.I., Officer of Clinical Department of JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.05.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 18.03.2019

Received 16.05.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 18.03.2019

ВИРУС ГЕПАТИТА В И САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ НУКЛЕАЗЫ: ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ CRISPR/Cas9 НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ

А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин^{1,2}, Д.Н. Зарифьян¹, Д.С. Чистяков⁴,
В.И. Гегечкори⁴, Е.О. Баюрова³, Е.В. Волчкова⁴, Д.С. Костюшев¹, В.П. Чуланов^{1,4}

¹ ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

³ ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

⁴ ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Хронический гепатит В — тяжелое заболевание печени, связанное с персистенцией вируса гепатита В в гепатоцитах человека. Хронический гепатит В является одним из самых распространенных заболеваний в мире. По обновленной статистике, более 250 млн человек хронически инфицированы, и более 1 млн человек умирают ежегодно из-за последствий ХГВ, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. Основная причина персистенции вируса гепатита В — особая суперспирализованная молекула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК в ядре. Современные методы терапии подавляют вирусную инфекцию, но не действуют напрямую на матрицы кольцевой ковалентно замкнутой ДНК, поскольку она существует в ядре гепатоцитов в виде минихромосомы и является недоступной для действия противовирусных препаратов. Как правило, после прекращения курса терапии наступает реактивация инфекции, поэтому прием противовирусных препаратов может быть неопределенно долгим. Одной из современных технологий, способных действовать напрямую на кольцевую ковалентно замкнутую ДНК, является система сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 организма *Streptococcus pyogenes*. SpCas9 белок можно привлекать к участку ккЗДНК с помощью короткого РНК-проводника, в результате чего SpCas9 вносит двуцепочечные разрывы, разрушая или мутируя вирусный геном. Тем не менее на сегодняшний момент использование CRISPR/Cas9 для терапии хронического гепатита В сопряжено с рядом проблем, в том числе с такой, как внецелевое действие нуклеаз (разрезание генома клеток). В последние годы было заявлено о создании нескольких технологий, использование которых может усиливать нуклеолитическую активность CRISPR/Cas9 (модифицированные РНК-проводники) или увеличивать специфичность SpCas9 белка (eSpCas9, более безопасная форма классического белка Cas9). В этой работе было проведено сравнение противовирусного действия CRISPR/Cas9 с классической формой белка SpCas9 и белком eSpCas9 с модифицированными и немодифицированными РНК-проводниками на культуре клеток *in vitro*. Показано, что система SpCas9 подавляет транскрипцию и репликацию вируса гепатита В на 90%, а также снижает уровень ккЗДНК на 94%, тогда как противовирусный эффект при использовании eSpCas9 оказывается существенно ниже. Несмотря на то что мо-

Адрес для переписки:

Костюшева Анастасия Павловна
111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, 3А,
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (925) 310-91-24.
E-mail: ak@rcvh.ru

Contacts:

Anastasiya P. Kostyusheva
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireevskaja str., 3A,
Central Research Institute of Epidemiology.
Phone: +7 (925) 310-91-24.
E-mail: ak@rcvh.ru

Библиографическое описание:

Костюшева А.П., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Чистяков Д.С.,
Гегечкори В.И., Баюрова Е.О., Волчкова Е.В., Костюшев Д.С.,
Чуланов В.П. Вирус гепатита В и сайт-специфические нуклеазы:
влияние генетических модификаций CRISPR/Cas9 на противовирусную
активность // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 279–287.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-279-287

Citation:

Kostyusheva A.P., Brezgin S.A., Zarifyan D.N., Chistyakov D.S.,
Gegechkory V.I., Bayurova E.O., Volchkova E.V., Kostyushev D.S.,
Chulanov V.P. Hepatitis B virus and site-specific nucleases: effects
of genetic modifications in CRISPR/Cas9 on antiviral activity // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 2, pp. 279–287. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-279-287

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-10426.

© Костюшева А.П. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-279-287>

дифицированные РНК-проводники должны улучшать нуклеолитическую активность CRISPR/Cas9 систем, модификация РНК-проводников также значительно снижает противовирусное действие CRISPR/Cas9. Таким образом, CRISPR/Cas9 сама по себе обладает высокой эффективностью действия, почти полностью блокируя транскрипцию и репликацию вируса гепатита В. Использование описанных технологий по улучшению свойств CRISPR/Cas9 нерационально при создании методов терапии на основе CRISPR/Cas9, а для элиминации генома вируса следует сосредоточиться на поиске эффективных РНК-проводников.

Ключевые слова: вирус гепатита В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, CRISPR/Cas9, специфичность, внецеллевые эффекты, эффективность, модифицированные РНК-проводники.

HEPATITIS B VIRUS AND SITE-SPECIFIC NUCLEASES: EFFECTS OF GENETIC MODIFICATIONS IN CRISPR/Cas9 ON ANTIVIRAL ACTIVITY

Kostyusheva A.P.^a, Brezgin S.A.^{a,b}, Zarifyan D.N.^a, Chistyakov D.S.^d, Gegechkory V.I.^d, Bayurova E.O.^c, Volchkova E.V.^d, Kostyushev D.S.^a, Chulanov V.P.^{a,d}

^a Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

^c Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation

^d I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chronic hepatitis B is a severe liver disease caused by persistent infection of hepatitis B virus in human hepatocytes. Chronic hepatitis B is one of the most common diseases in the world. According to recent estimations, more than 250 million people are chronically infected and more than 1 million of people die annually due to consequences of chronic hepatitis B: liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The key factor of hepatitis B virus persistency is a special form of viral genome called circular covalently closed DNA. Current therapeutics suppress viral replication but have no effect on circular covalently closed DNA as it exists in the nuclei of hepatocytes as a minichromosome and is not accessible for therapeutics. Commonly, viral reactivation occurs after cessation of treatment. Therefore, duration of antiviral treatment is supposed to be indefinitely long. One of the most promising approaches to target circular covalently closed DNA is the technology of site-specific nucleases CRISPR/Cas9 from *Streptococcus pyogenes*. A short guide RNA recruits an SpCas9 protein to the viral genome and induces generation of DNA double strand breaks. However, there are several limitations of CRISPR/Cas9 hampering translation of this technology into the clinic. First, efficacy of CRISPR/Cas9 needs to be improved. Second, CRISPR/Cas9-mediated off-target mutagenesis represents a menacing problem which has to be addressed. To overcome these limitations, several approaches have been devised to improve CRISPR/Cas9 activity (modification of guide RNAs) and reduce off-target mutagenesis (a Cas9 protein with enhanced specificity, eSpCas9). In this study, we compared antiviral activity of a classic SpCas9 with an eSpCas9 system as well as analyzed effects of gRNAs modification on anti-HBV effects. Here, we demonstrated that SpCas9 has the highest antiviral potency, reducing transcription and replication of HBV over 90%. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA declined over 90% post CRISPR/Cas9 transfection. Although it was previously shown that modified guide RNAs increase nucleolytic activity of CRISPR/Cas9, our results indicated that this modification impairs antiviral activity of CRISPR/Cas9. To conclude, CRISPR/Cas9 effectively suppress viral replication and transcription *per se*. Described modifications do not potentiate antiviral activity of CRISPR/Cas9 system and should not be used for development of future therapeutics. The best strategy to improve CRISPR/Cas9 efficacy is to design new highly effective guide RNAs.

Key words: hepatitis B virus, circular covalently closed DNA, CRISPR/Cas9, specificity, off-target effects, efficiency, modified gRNAs.

Введение

По оценкам ВОЗ смертность от вирусных гепатитов в мире с 2000 г. возросла на 22% и превысила таковую от ВИЧ-инфекции. В 2015 г. от вирусных гепатитов и их последствий — цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы — умерло 1,34 млн человек [18]. Распространенность хронического гепатита В (ХГВ) в мире достигает 250 млн человек [7]. Причиной хронизации инфекции является особая форма генома вируса — кольцевая ковалентно замкнутая ДНК (ккзДНК), которая служит матрицей для транскрипции всех вирусных РНК [14]. Современные

подходы к лечению ХГВ основываются на применении препаратов интерферона и/или аналогов нуклеозидов/нуклеотидов (энтекавир, тенофовир). В первом случае эффективность лечения в целом невысока. Во втором случае лечение энтекавиром или тенофовиром позволяет подавить репликацию вируса гепатита В (ВГВ) практически у всех пациентов, однако для большинства срок лечения может быть неопределенно долгим [3, 8]. И в том, и в другом случае после завершения лечения вирусная репликация, как правило, возобновляется [10]. Несмотря на то что современные противовирусные препараты эффективно подавляют репликацию вируса,

ккзДНК ВГВ остается нечувствительной к противовирусной терапии [19]. Таким образом, для излечения пациентов, страдающих хроническим гепатитом В, необходима разработка новых, более эффективных препаратов, нацеленных на деградацию ккзДНК [1].

В ряде исследований было продемонстрировано, что сайт-специфичная эндонуклеаза CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes* может эффективно разрезать вирусный геном [5, 9, 13, 16, 22]. При действии эндонуклеаз снижаются уровни всех основных форм генома ВГВ и подавляется продукция вирусных белков. Однако на данный момент использование систем CRISPR/Cas9 для излечения ХГВ сопряжено с рядом нерешенных задач. На моделях ВГВ эффективность CRISPR/Cas9 систем остается невысокой и требует улучшения. В некоторых исследованиях под действием нуклеаз CRISPR/Cas9 происходило значительное снижение уровней HBsAg, поверхностного белка вируса, однако остаточная секреция HBsAg все же сохранялась, что свидетельствует об остаточной активности репликативно-компетентных матриц ккзДНК ВГВ и указывает на возможность реактивации инфекции после прекращения терапии [11, 16]. Действительно, остаточные матрицы после действия CRISPR/Cas9 продолжают транскрибироваться и производить вирусные белки [15].

Увеличение эффективности действия CRISPR/Cas9 на ккзДНК особенно важно, поскольку имеющиеся данные по разрушению генома ВГВ системами нуклеаз были получены на искусственных моделях, которые лишь частично имитируют жизненный цикл вируса и не повторяют особенностей ккзДНК в гепатоцитах пациентов с ХГВ. Известно, что ккзДНК существует в виде минихромосом, а у пациентов с ХГВ может персистировать в транскрипционно активном и неактивном состояниях. Часть матриц ккзДНК существует в гетерохроматизированном состоянии, недоступном для внешних воздействий [2, 12]. Следовательно, стоит ожидать, что система CRISPR/Cas9, разрушающая ккзДНК на моделях ВГВ, будет менее эффективна у пациентов с ХГВ.

В целях усиления нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 ранее был предложен способ модификации шпильки РНК-проводника, необходимого для узнавания Cas9 белком целевой последовательности. Из 24 использованных в исследовании РНК-проводников, 18 модифицированных РНК-проводников продемонстрировали более высокую эффективность в разрезании целевой мишени. Предположительно, модификация РНК-проводников увеличивает сродство Cas9 белка к РНК-проводнику либо усиливает стабильность рибонуклеопротеинового комплекса [4].

Другим важным параметром работы CRISPR/Cas9 является специфичность действия, которая характеризует вероятность внесения разрывов ДНК и мутаций по нецелевым сайтам в геноме человека. Исходами внецелевого действия CRISPR/Cas9 могут стать генетические aberrации, нарушение работы генов, трансформация клеток и др. [21]. Следовательно, минимизация или полное устранение возможности внесения внецелевых разрывов необходимо для безопасного использования сайт-специфических нуклеаз у человека. Методами генной инженерии в ряде работ были созданы укороченные РНК-проводники [6], использованы комбинации РНК-проводников и белков Cas9 с низкой активностью (способностью разрезать одну цепь ДНК) [20], а также созданы мутантные формы белка Cas9 (enhanced SpCas9, eSpCas9), в меньшей степени способные к связыванию с нецелевыми матрицами ДНК [17].

В нашей работе было изучено влияние системы CRISPR/Cas9 с увеличенной специфичностью (eSpCas9) и/или модифицированными РНК-проводниками на транскрипцию и репликацию ВГВ в сравнении с классической системой CRISPR/Cas9. Выявлено, что классический белок Cas9 эффективно снижает транскрипцию вируса и уровни ккзДНК, в то время как eSpCas9 обладает менее выраженной эффективностью действия и не вызывает значительного подавления ВГВ. Модификация РНК-проводников существенно снижает противовирусную активность CRISPR/Cas9. Таким образом, можно заключить, что системы CRISPR/Cas9 обладают достаточной эффективностью действия и не требуют дополнительных модификаций.

Материалы и методы

Линии клеток. Клетки гепатомы человека HepG2 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (Thermo Fisher Scientific), 1% фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин при 37°C (5% CO₂). Клетки рассаживали в 24-луночные планшеты с 60% плотностью, трансфицировали плазмидой, кодирующей геном ВГВ (HBV-1.1-mer, предоставлена Dieter Glebe, Университет Гиссена), или 1.0-mer кольцевым геном ВГВ, плазмидой Cas9-P2A-EGFP (предоставлена Phil Sharp и Feng Zhang, Addgene plasmid #63592), или плазмидой, кодирующей высокоспецифичный белок Cas9 (eSpCas9) предоставлено Feng Zhang, Addgene plasmid #71814) и ПЦР-продуктом, кодирующим немодифицированный или модифицированный РНК-проводник под U6-промотором (плазмида для получения ПЦР-продукта предоставле-

на Eric Lander и David Sabatini, Addgene plasmid #50662) при помощи полиэтиленimina. Через 24 ч среду отбирали, клетки промывали дважды фосфатным буфером, меняли среду на полную и инкубировали в течение еще 48 ч.

Получение рекомбинантной ккзДНК ВГВ. Линейный геном ВГВ получали с помощью рестрикции ДНК ВГВ-содержащей плазмиды рСН-НВВ (предоставлено Dieter Glebe, Университет Гиссена) с помощью рестрикции ферментами PstI и PstI в буфере Y (Сибензим), как показано ранее. Линейный геном ВГВ (3182 пары нуклеотидов) был очищен с помощью гель-электрофореза и выделен из геля набором Qiagen gel extraction kit. Религирование цепей ДНК ВГВ проводили с ДНК-лигазой T4 (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре ночью, продукты лигирования осаждали изопропанолом и очищали гель-электрофорезом. Фрагмент кольцевой полноразмерной ДНК ВГВ вырезали из геля и выделяли набором Qiagen gel extraction kit.

Дизайн РНК-проводников и получение ПЦР-продуктов. Мишени в геноме ВГВ были подобраны с использованием сервиса Broad Institute Genetic Perturbation Platform (portals.broadinstitute.org) и программы Geneious 7.1.9. ПЦР-продукт с У6-промотором, кодирующий классический или модифицированный РНК-проводник, получали при помощи двухэтапного мутагенного ПЦР с высокоточной полимеразой Q5 (New England Biolabs), с проведением амплификации с плазмиды pLX-sgRNA (Addgene plasmid #50662). РНК-проводник содержит мишень в геноме ВГВ и шпильку, необходимую для распознавания белком *S. pyogenes* Cas9. Праймеры, использованные для синтеза РНК-проводников, указаны в таблице.

Микроскопия. Клетки после трансфекции анализировали на микроскопе Olympus IX71 при 488 нм и методом микроскопии в светлом поле при 10-кратном увеличении.

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора AmpliSens «РИБО-преп» по протоколу производителя, добавляя лизирующий буфер непосредственно к клеткам после удаления среды и двукратного промывания фосфатным буфером. Для выделения прегеномной РНК ВГВ, нуклеиновые кислоты обрабатывали ДНКазой I типа без РНКазной активности (Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин при 37°C, после чего РНК перевыделяли с помощью набора AmpliSens «РИБО-преп» и проводили постановку обратной транскрипции с помощью набора AmpliSens «РЕВЕРТА-Л». Для выделения ккзДНК ВГВ, ДНК обрабатывали в течение 12 ч ферментом Plasmid-safe ATP-dependent DNase (Epicentre) при 37°C для разрушения всех форм ДНК, кроме ккзДНК с последующей инактивацией фермента в течение 30 мин при 70°C.

Полуколичественный ПЦР-анализ проводили со специфическими праймерами и зондами TaqMan на прегеномную РНК ВГВ (пгРНК), S-РНК ВГВ, GAPDH, ДНК ВГВ, β -глобина генома, ккзДНК ВГВ (см. табл.). Праймеры на β -глобин были использованы из набора «Амплисенс HBV monitor-FL».

Статистическую обработку проводили с помощью t-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (где применимо) с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 19.0.0.0, попарные апостериорные сравнения производили с помощью критерия Тьюки.

Результаты

Активность систем CRISPR/Cas9 на уровне транскрипции ВГВ

Были созданы 4 РНК-проводника, нацеленные на регуляторные и кодирующие участки генома ВГВ: Sg1, Sg2, Sg3, Sg4 (рис. 1А, II обложка). Мишенями РНК-проводников в геноме ВГВ были регионы полимеразы ВГВ и Эхансера I (Sg1), а также полимеразы и X-белка (Sg2, Sg3, Sg4). Клетки HepG2 были котрансфицированы рекомбинантной ккзДНК (рккзДНК), плазмидой, кодирующей белок SpCas9 либо eSpCas9, и ПЦР-продуктом под У6-промотором, кодирующим РНК-проводник с немодифицированной (Sg1–4) либо с модифицированной (Sg1X–4X) шпилькой. Противовирусное действие оценивали на 4 сутки после трансфекции по снижению транскрипции прегеномной РНК (пгРНК) и S-РНК относительно контрольного образца (схема эксперимента представлена на рисунке 1Б, II обложка). Эффективность трансфекции составила 25% (рис. 1В, II обложка). ВГВ характеризуется малой кодирующей емкостью, поэтому двуцепочечный разрыв в любом участке генома может приводить к мутациям со сдвигами рамок считывания и снижению транскрипции ккзДНК (уровни пгРНК и S-РНК). Снижение транскрипции и репликации вируса также может быть связано с деградацией ккзДНК после действия CRISPR/Cas9.

Каждый из 4 немодифицированных РНК-проводников системы SpCas9 значительно подавляет транскрипцию ВГВ (от 50 до 90%) (рис. 2А, Б). Наиболее эффективным оказался РНК-проводник Sg1, который снижает уровень пгРНК на 76%, а уровень S-РНК на 90%. РНК-проводники с модифицированными шпильками оказывали значительно менее выраженный противовирусный эффект. Максимальное снижение транскрипции ВГВ составляло всего 30% (рис. 2А, Б). Подавление транскрипции ВГВ с помощью CRISPR/Cas9 с любым из использованных РНК-проводников с модифици-

Таблица. Список праймеров и зондов

Table. List of primers and probes

Мишень Target	Тип Type	Последовательность Sequence	Т отжига Annealing T
ккзДНК cccDNA	Прямой Forward	5'-CCGTGTGCACTTCGCTTCA-3'	60°C
	Обратный Reverse	5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGA-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-CATGGAGACCACCGTGAACGCCC-3' (BHQ1)	
пгРНК pgRNA	Прямой Forward	5'-GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT-3'	62°C
	Обратный Reverse	5'-CATTGAGATTCCTCGAGATTGAGAT-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA-3' (BHQ1)	
мРНК GAPDH GAPDH mRNA	Прямой Forward	5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'	51°C
	Обратный Reverse	5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTA-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-CGCCTGGTCACCAGGGCTGC-3' (BHQ1)	
S-РНК S-RNA	Прямой Forward	5'-TCCTCCAACCTTGCTCTGTTATC-3'	60°C
	Обратный Reverse	5'-AGATGAGGCATAGCAGCAGGAT-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-ATGATAAAACGCCGACAGACATCCAGC-3' (BHQ1)	
Sg1/Sg1X	Прямой (Sg1) Forward	5'-TCCGCAGTATGGATCGGCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg1X) Forward	5'-TCCGCAGTATGGATCGGCAGGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-CTGCCGATCCATACTGCCGACGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Sg2/Sg2X	Прямой (Sg2) Forward	5'-GCAGATGAGAAGGCACAGACGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg2X) Forward	5'-GCAGATGAGAAGGCACAGACGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-GTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Sg3/Sg3X	Прямой (Sg3) Forward	5'-GAGGTGAAGCGAAGTGCACAGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg3X) Forward	5'-GAGGTGAAGCGAAGTGCACAGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-TGTGCACTTCGCTTACCTCCGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Sg4/Sg4X	Прямой (Sg4) Forward	5'-CTTCACCTCTGCACGTGCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg4X) Forward	5'-CTTCACCTCTGCACGTGCGAGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-TGCGACGTGCAGAGGTGAAGCGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Праймеры для получения ПЦР продуктов Primers for synthesis of PCR-products	Прямой Forward	5'-TATATAGGATCCGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTG-3'	50°C
	Обратный Reverse	TATATAGCTAGCAAAAAAAGCACCGACTCGG-3'	

рованной шпилькой статистически значимо ниже, чем при использовании классической системы CRISPR/Cas9. Снижение уровней пгРНК и S-РНК было более выраженным с немодифицированными РНК-проводниками на 55% (рис. 2А) и 78% (рис. 2Б) соответственно.

Помимо классической системы SpCas9, указанные РНК-проводники были использованы для подавления транскрипции ВГВ с модифицированным белком eSpCas9. По результатам оценки транскрипции ВГВ eSpCas9 показал значительно меньший противовирусный эффект, чем классический белок SpCas9. Использование немодифицированного РНК-проводника Sg1 достигалось снижение пгРНК всего лишь на 41%,

а S-РНК — на 30%, что на 35 и 60% менее эффективно, чем при использовании классического белка (рис. 2В, Г). Таким образом, модификация РНК-проводника и использование мутантной формы SpCas9 белка снижает противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на модели ВГВ.

Подавление транскрипции и репликации ВГВ системами CRISPR/Cas9

Использование CRISPR/Cas9 для лечения ХГВ рационально прежде всего потому, что основной компонент жизненного цикла ВГВ, ответственный за персистенцию вируса, представляет собой двуцепочечный ДНК-содержащий геном (ккзДНК). Разрушение ккзДНК явля-

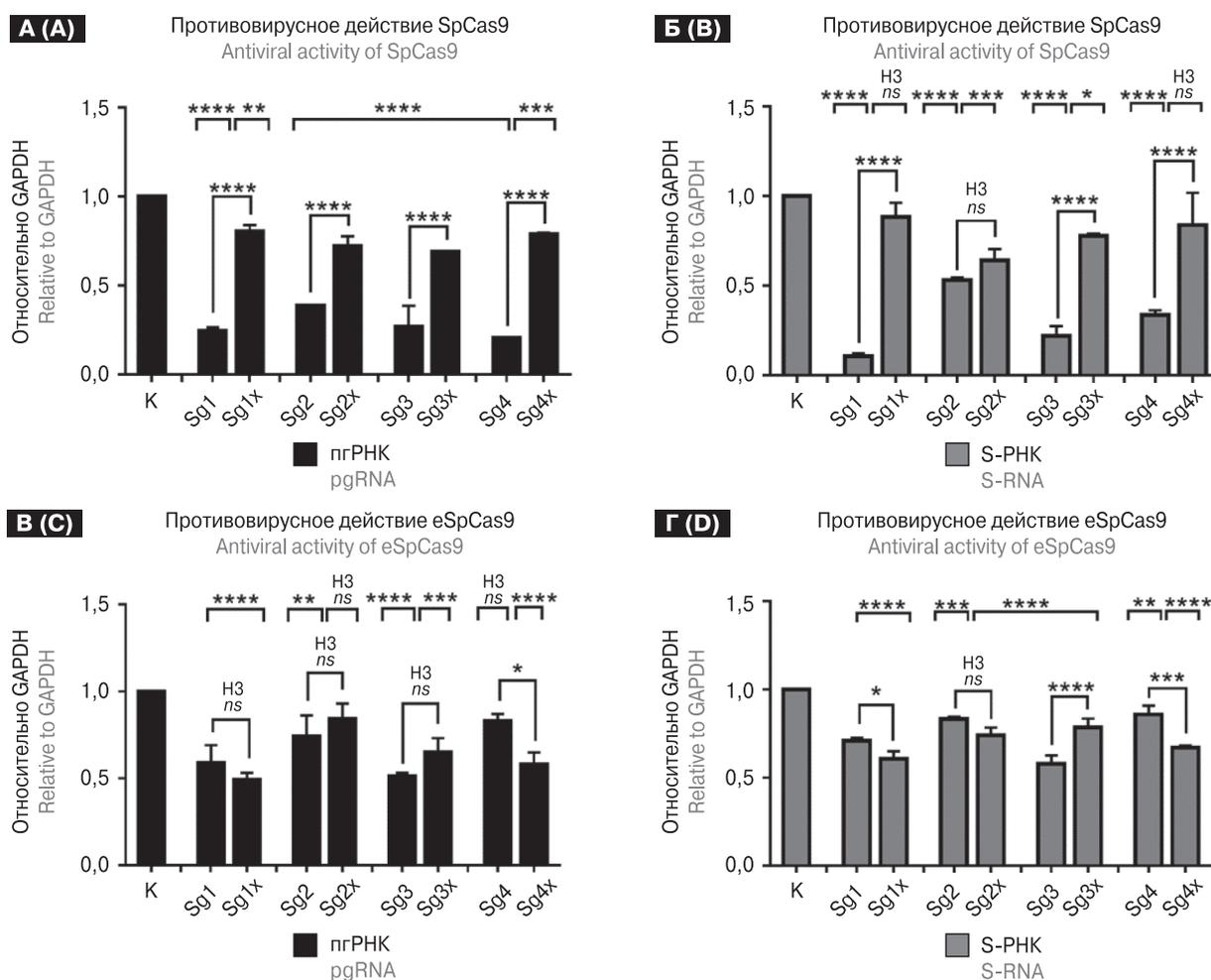


Рисунок 2. Действие CRISPR/Cas9 на транскрипцию ВГВ

Figure 2. Effects of CRISPR/Cas9 systems on HBV transcription

А-Б) Экспрессия пгРНК (А) и S-РНК (Б) относительно мРНК Cas9 после действия SpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками. В-Г) Экспрессия пгРНК (В) и S-РНК (Г) относительно мРНК Cas9 после действия eSpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, H3 — незначимые отличия. В верхней части графика указаны статистические отличия экспериментальных групп от группы контроля.

А-В) pgRNA (А) and S-RNA (Б) expression levels relative to Cas9 mRNA after transfection of SpCas9 with modified/unmodified gRNAs. C-D) pgRNA (C) and S-RNA (D) expression levels relative to Cas9 mRNA after transfection eSpCas9 with modified/unmodified guide. The data presented as mean±standard deviation. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, ns — difference is not significant. Significant difference in experimental vs. control group is depicted on the top of each graph.

ется основной целью противовирусной терапии с помощью CRISPR/Cas9. Для изучения действия систем CRISPR/Cas9 на ккзДНК и репликацию ВГВ, была использована модель котрансфекции клеток HepG2 системами CRISPR/Cas9 и рккзДНК, полученной с помощью лигирования *in vitro*. SpCas9 с немодифицированными РНК-проводниками ожидаемо снижал уровни ккзДНК на 70–96% (рис. 3А). Для модифицированных РНК-проводников уровень ккзДНК снижается на 65, 33, 23, 72% для РНК-проводников Sg1X, Sg2X, Sg3X, Sg4X соответственно. При этом эффективность дей-

ствия этих РНК-проводников ниже, чем у классических РНК-проводников на 89, 18, 20 и 54%. Как на уровне транскрипции, так и на уровне ккзДНК eSpCas9 действовал гораздо менее выражено, чем SpCas9: для Sg1 с eSpCas9 относительное число матриц ккзДНК не отличалось от контрольного значения (снижение на 4%), в то время как Sg1 с SpCas9 снижал пул ккзДНК на 93% (рис. 3Б).

В дополнение, для оценки изменения в продукции вирионов, было проведено измерение уровней секретируемой ДНК ВГВ при действии SpCas9. Продукция вирусных частиц снижалась

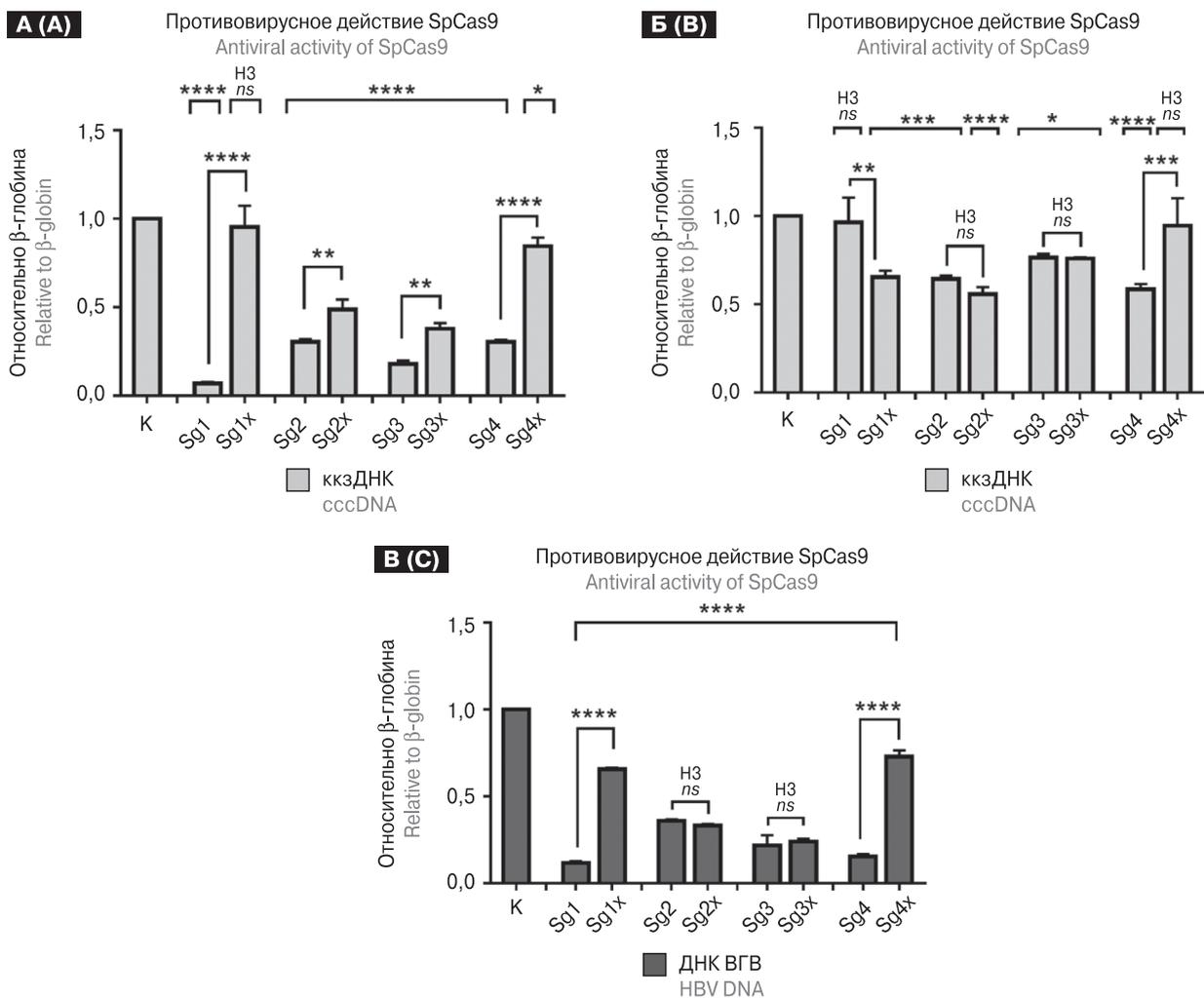


Рисунок 3. Действие CRISPR/Cas9 на уровни ккзДНК и ДНК ВГВ

Figure 3. Effects of CRISPR/Cas9 systems on cccDNA and HBV DNA levels

А) Уровни ккзДНК после действия SpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками; В) уровни ккзДНК после действия eSpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками; С) уровни секретируемой ДНК ВГВ после действия SpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ нормализованы относительно ДНК плазмид Cas9. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, H3 — не значимые отличия. В верхней части графика указаны статистические отличия экспериментальных групп от группы контроля.

A) cccDNA levels after transfection of SpCas9 with modified/unmodified gRNAs; B) cccDNA levels after transfection of eSpCas9 with modified/unmodified gRNAs; C) HBV DNA levels after SpCas9 editing with modified/unmodified gRNAs. cccDNA and HBV DNA levels are measured relative to Cas9 expressing plasmid level. The data presented as mean±standard deviation.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, ns — difference is not significant. Significant difference in experimental vs. control group is depicted on the top of each graph.

для всех классических РНК-проводников ($p < 0,0001$), максимальное снижение на 89% наблюдается при использовании РНК-проводника Sg1 (рис. 3B).

Обсуждение

Системы CRISPR/Cas9 — многообещающие молекулярные инструменты, которые обладают колоссальным потенциалом для разработки противовирусных лекарственных средств, в том числе против неизлечимых, хронических инфекционных заболеваний. CRISPR/Cas9 просты в использовании, обладают высокой эффективностью действия и могут быть оптимизированы для расщепления практически любой последовательности вирусного генома. В последние годы был опубликован ряд научных работ по действию CRISPR/Cas9 систем на ВГВ как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 9, 13, 16, 22]. Упомянутые исследования проводились на различных моделях репликации ВГВ и показали значительное подавление вирусной инфекции. В данной работе был создан набор эффективных РНК-проводников, включая Sg1, который снижает уровень транскрипции вируса на 90%, уровни ккзДНК — на 94%, а уровень секретируемой ВГВ ДНК — на 89%, что свидетельствует о почти полном подавлении транскрипции и репликации вируса.

В данной работе также была изучена возможность улучшения системы CRISPR/Cas9 за счет использования мутантной формы белка eSpCas9 и модифицированных РНК-проводников. В структуре эффекторного белка eSpCas9 имеется положительно заряженная полость, которая участвует в стабилизации цепи ДНК при гибридизации РНК-проводника. При уменьшении положительного заряда связывающей полости путем замены положительно заряженных аминокислот данной области на нейтральные, связывание Cas9 белка с нецелевыми цепями ослабевает, и вероятность расщепления

нецелевых мишеней в геноме снижается. Таким образом, eSpCas9 можно считать более безопасным аналогом классического белка SpCas9 [17]. В нашей работе показано, что несмотря на более высокую специфичность, система eSpCas9 обладает очень низкой эффективностью действия по сравнению с классической SpCas9. Модификация РНК-проводников также не улучшает анти-ВГВ активность CRISPR/Cas9. Несмотря на то что в работе Dang с соавт. [4] было показано, что модификация РНК-проводников может увеличивать эффективность генетического редактирования, не подвергшиеся модификации РНК-проводники подавляют транскрипцию и репликацию ВГВ гораздо более эффективно (вплоть до 90%). Все изученные параметры вирусного цикла (пгРНК, S-РНК, ккзДНК, ДНК ВГВ) снижались под действием классической системы CRISPR/Cas9 более значительно, чем при использовании любой из возможных модификаций.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что созданный ранее белок Cas9 с улучшенной специфичностью и модификация РНК-проводников значительно снижают противовирусное действие CRISPR/Cas9 на модели ВГВ. С другой стороны, классическая система SpCas9 сама по себе имеет очень высокую эффективность действия и практически полностью подавляют транскрипцию и репликацию ВГВ. По мнению авторов, для создания терапевтического подхода на основе CRISPR/Cas9 следует сосредоточиться не на улучшении компонентов классической системы *S. pyogenes* CRISPR/Cas9, а на создании эффективных РНК-проводников (например, Sg1) и поиске более специфичных систем CRISPR/Cas9 с меньшей способностью вносить внецелевые разрывы в ДНК (например, ортологичных систем CRISPR/Cas9). Использование CRISPR/Cas9 в комбинации с современными препаратами интерферона или аналогов нуклеоз(т)идов может стать основой для разработки подходов к противовирусной терапии ХГВ с полной элиминацией вируса.

Список литературы/References

1. Чуланов В.П., Зуева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В. Гепатит С стал излечим. Гепатит В следующий? // Терапевтический архив. 2017. Т. 89, № 11. С. 4–13. [Chulanov V.P., Zueva A.P., Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Volchkova E.V., Maleev V.V. Hepatitis C can be cured: will hepatitis B become next? *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2017, vol. 89, no. 11, pp. 4–13. doi: 10.17116/terarkh201789114-13 (In Russ.)]
2. Allweiss L., Dandri M. The role of cccDNA in HBV maintenance. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 2, p. 156. doi: 10.3390/v9060156
3. Chang T.T., Lai C.L., Kew Yoon S. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2010, vol. 51, no. 2, pp. 422–430. doi: 10.1002/hep.23327
4. Dang Y., Jia G., Choi J. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol.*, 2015, vol. 16, p. 280. doi: 10.1186/s13059-015-0846-3
5. Dong C., Qu L., Wang H., Wei L., Dong Y., Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.*, 2015, vol. 118, pp. 110–117. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015
6. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808
7. Ganem D., Prince A.M. Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 350, no. 11, pp. 1118–1129. doi: 10.1056/NEJMra031087

8. Janssen H.L.A., Zonneveld M., Senturk H. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9454, pp. 123–129. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17701-0
9. Karimova M., Beschorner N., Dammermann W. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, p. 13734. doi: 10.1038/srep13734
10. Lim S.G., Wai C.T., Rajnakova A., Kajiji T., Guan R. Fatal hepatitis B reactivation following discontinuation of nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 597–599. doi: 10.1136/gut.51.4.597
11. Lin S.R., Yang H.C., Kuo Y.T. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014, vol. 3: e186. doi: 10.1038/mtna.2014.38
12. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, vol. 64, iss. 12, pp. 1972–1984. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309809
13. Ramanan V., Shlomai A., Cox D.B.T. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, p. 10833. doi: 10.1038/srep10833
14. Seeger C., Mason W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, no. 1, pp. 51–68. doi: 10.1128/MMBR.64.1.51-68.2000
15. Seeger C., Sohn J.A. Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.*, 2016, vol. 24, no. 7, pp. 1258–1266. doi: 10.1038/mt.2016.94
16. Seeger C., Sohn J.A. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014, vol. 3: e216. doi: 10.1038/mtna.2014.68
17. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, vol. 351, no. 6268, pp. 84–88. doi: 10.1126/science.aad5227
18. WHO. Global hepatitis report 2017. *World Health Organization*, 2017.
19. Yang H.C., Kao J.H. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerg. Microbes Infect.*, 2014, vol. 3, no. 9: e64. doi: 10.1038/emi.2014.64
20. Yin H., Xue W., Chen S. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.*, 2014, vol. 32, no. 6, pp. 551–553. doi: 10.1038/nbt.2884
21. Zhang X.H., Tee L.Y., Wang X.G., Huang Q.S., Yang S.H. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2015, vol. 4: e264. doi: 10.1038/mtna.2015.37
22. Zhu W., Xie K., Xu Y. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res.*, 2016, vol. 217, pp. 125–132. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.003

Авторы:

Костюшева А.П., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Брезгин С.А., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; аспирант лаборатории № 73 клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии, Москва, Россия;

Зарифьян Д.Н., лаборант-исследователь лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Чистяков Д.С., лаборант лаборатории вирусных гепатитов, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Гегечкори В.И., к.ф.н., старший преподаватель, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Баюрова Е.О., младший научный сотрудник лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян отдела инновационных биотехнологических препаратов ФГБНУ ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

Волчкова Е.В., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней, зав. кафедрой инфекционных болезней медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Костюшев Д.С., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Чуланов В.П., д.м.н., зав. лабораторией вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры инфекционных болезней медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Kostyusheva A.P., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Brezgin S.A., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; PhD Student, Laboratory No. 73 of Clinical Pharmacology, Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation;

Zarifyan D.N., Research Technician, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Chistyakov D.S., Technician, Laboratory of Viral Hepatitis, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Gegechkory V.I., PhD (Pharmaceutical Sciences), Senior Faculty Member, Assistant Professor, A.P. Arzamastsev Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Bayurova E.O., Junior Researcher, Laboratory of Immunobiological Processes Modeling with the Experimental Clinic of the Marmosets of the Department of Innovative Biotechnological Preparations, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS, Moscow, Russian Federation;

Volchkova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Infectious Diseases, Head of the Department of Infectious Diseases, Preventive Medicine Department, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Kostyushev D.S., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Chulanov V.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Infectious Diseases, Preventive Medicine Department, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.09.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 15.03.2019

Received 13.09.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 15.03.2019

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В СЛУЧАЯХ ПОЗДНЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА

Л.В. Кравченко

ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Цель исследования: изучить особенности нарушений активации Т-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ) в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в крови и в моче. *Материалы и методы.* Обследовано 147 новорожденных с неспецифической клинической симптоматикой. Проведено типирование лимфоцитов к кластерам дифференцировки CD3, CD4, CD8, CD20, CD3⁺CD28⁻, CD3⁺CD28⁺, CD3⁻CD28⁺, CD20⁺CD40⁺, CD28, CD40 с помощью моноклональных антител фирмы Immunotech (Франция). Экспрессию мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «Beckman Coulter» EpicsXLII. У 123 новорожденных ЦМВИ была подтверждена положительным результатом ДНК-диагностики, проведенной методом полимеразной цепной реакции, у 24 получен отрицательный результат ДНК-диагностики. В возрасте от 1,5 до 3 месяцев у 24 детей, имевших на 1 месяце отрицательный результат ДНК-диагностики, была обнаружена ДНК ЦМВ в крови или моче и нарастание анти-ЦМВ IgG, позволившие установить диагноз ЦМВИ. *Результаты.* У детей с ЦМВИ при позднем обнаружении ДНК ЦМВ уровень CD3⁺CD28⁺ имеет прямо пропорциональную зависимость от уровня CD3⁺ и не зависит от уровня CD28. Максимальные значения CD3⁺CD28⁺ (70–80%) зарегистрированы при CD3 в диапазоне от 85 до 90%. У детей с ЦМВИ при раннем выявлении ДНК ЦМВ максимальный уровень CD3⁺CD28⁺ ассоциировался с пониженным уровнем CD3⁺ (45–55%) и высоким уровнем CD28 (выше 3%). Т-лимфоциты с макерами активации CD3⁺CD28⁺, через которые в клетку проводятся костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-хелперов, являются одним из статистически значимых для постановки диагноза фактором. Дефицит CD28 молекул, который приводит к отмене костимулирующего сигнала и анергии Т-лимфоцитов, носит негативный характер и способствует развитию иммунологической недостаточности при ЦМВИ у новорожденных. Полученные результаты исследования подтвердили важность контактного взаимодействия иммунокомпетентных клеток между собой и с другими клетками организма для осуществления противовирусного иммунного ответа организма на внедрение ЦМВ у детей первых месяцев жизни. Предложена формула зависимости прогноза ЦМВИ от содержания в сыворотке крови лимфоцитов с рецепторами CD3⁺, CD28⁺CD3 у новорожденных, имеющих неспецифическую клиническую симптоматику, при позднем обнаружении ДНК ЦМВ.

Ключевые слова: новорожденные, цитомегаловирусная инфекция, лимфоциты, молекулы костимуляции.

Адрес для переписки:

Кравченко Лариса Вахтанговна
344012, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43
ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 (863) 232-56-64.
E-mail: larakra@list.ru

Contacts:

Larisa V. Kravchenko
344012, Russian Federation, Rostov-on-Don, Mechnikova str., 43,
Rostov State Medical University.
Phone: +7 (863) 232-56-64.
E-mail: larakra@list.ru

Библиографическое описание:

Кравченко Л.В. Роль нарушений активации Т-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 288–294. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-288-294

© Кравченко Л.В., 2019

Citation:

Kravchenko L.V. A role of impaired neonatal T cell activation upon late CMV detection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 288–294. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-288-294

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-288-294>

A ROLE OF IMPAIRED NEONATAL T CELL ACTIVATION UPON LATE CMV DETECTION

Kravchenko L.V.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Objective: examine signs of impaired neonatal T cell activation upon late cytomegalovirus (CMV) DNA detection in the blood and urine. *Materials and methods.* 147 neonates with non-specific clinical symptoms were enrolled to the study. Peripheral blood lymphocyte subsets were immunophenotyped by using anti-human antibody panel to stain for surface markers CD3, CD4, CD8, CD20, CD3⁺CD28⁻, CD3⁺CD28⁺, CD3⁻CD28⁺, CD20⁺CD40⁺, CD28, CD40 (IMMUNOTECH, France) for further analysis on a laser flow cytometer Beckman Coulter Epics XL II. CMV infection in 123 neonates was verified by PCR, whereas it was negative in 24 cases. Further, 24 children aged 1.5–3 months negative for CMV DNA during the first month of life were later shown to contain it in the blood and urine samples as well as elevated anti-CMV IgG antibodies allowing to verify CMV infection. *Results.* It was found that upon late CMV DNA detection, amount of CD3⁺CD28⁺ T cells in peripheral blood was directly related to count of total CD3⁺ T cells regardless of CD28 expression. Moreover, the peak percentage of CD3⁺CD28⁺ (70–80%) T cells ranged within 85–90%. Whereas children upon early CMV detection the maximum percentage of CD3⁺CD28⁺ T cells was associated with lowered CD3⁺ T cell count (45–55%), it was also paralleled with high CD28 expression (higher than 3%). Importantly, T cells co-expressing CD28⁺ activation marker necessary for co-stimulation represent one of significant parameters used in diagnostics. Down-modulated CD28 expression abrogating costimulatory signaling and resulting in T cell anergy contributes to developing immunological failure in neonatal CMV infection. The data obtained confirmed importance of cell-cell immune and non-immune interactions for executing anti-CMV immune response within the first months of life. Finally, it is proposed to predict developing CMV infection depending on percentage of CD3⁺ and CD28⁺CD3⁺ T cell subsets in neonates manifested with non-specific clinical signs upon late CMV DNA detection.

Key words: neonates, cytomegalovirus infection, T-lymphocytes, impaired activation.

Цитомегаловирусная инфекция в настоящее время отнесена к группе болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии. В различных странах мира, по данным Всемирной организации здравоохранения, отмечается рост заболеваемости цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ). Анте- и постнатальная диагностика ЦМВИ затруднена, что связано с особенностями иммунной системы новорожденных [5, 13].

Диагноз ЦМВИ не может быть установлен только на основании клинических данных, так как симптомы заболевания характеризуются неспецифичностью. Это заболевание у новорожденных характеризуется склонностью к генерализации, высокой частотой поражения ЦНС, трудностью диагностики, прогнозирования течения, высокой частотой инвалидизации, так как уже в течение первых месяцев жизни постепенно начинает формироваться задержка психомоторного развития и другие «поздние» проявления врожденной ЦМВИ [2, 6, 8, 10].

Одна из проблем, с которой сталкиваются клиницисты при лечении герпесвирусной инфекции, является выраженность иммунных нарушений у больных [1, 3, 5, 4, 7, 13]. Доказано, что экспрессия на клеточной поверхности Т-лимфоцита, помимо антигенраспознающего рецептора и корецепторов костимулирующих молекул, усиливает сигнал, поставляемый рецептором/корецептором. Костимуляция Т-клеток —

обязательный компонент презентации антигена и условие их эффективной активации. Презентация антигена без костимуляции приводит к развитию анергии Т-клеток.

Учитывая, что в настоящее время ЦМВИ рассматривается в качестве ведущего фактора формирования вторичных иммунодефицитов в детском возрасте, становится очевидной необходимость изучения особенностей иммунологических нарушений и выявления преморбидных факторов риска у детей с ЦМВИ [8, 9, 10, 11, 12].

Цель: изучить особенности нарушений активации Т-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в крови и в моче.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных 147 новорожденных с ЦМВИ, родившихся у матерей с хроническими воспалительными гинекологическими заболеваниями. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией, принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия), одобрено локальным Этическим комитетом НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Всем пациентам была проведена на первом месяце жизни ДНК-диагностика — полимеразная цепная реакция (ПЦР) мочи и крови. У 24 детей был получен отрицательный результат. В возрасте от 1,5 до 3 месяцев у 24 детей, имевших на 1 месяце отрицательный результат ДНК-диагностики, был обнаружен цитомегаловирус в крови или моче, и нарастание анти-ЦМВ- IgG, что позволило установить диагноз ЦМВИ. Они составили основную группу — дети с ЦМВИ при позднем обнаружении ДНК ЦМВ.

У 123 детей диагноз ЦМВИ был подтвержден положительным результатом ПЦР на первом месяце жизни. Они составили контрольную группу — дети с ЦМВИ при раннем выявлении ДНК ЦМВ.

Для выявления ДНК ЦМВ использовали метод ПЦР. В качестве материала для исследования у пациентов служили периферическая кровь и моча. Обнаружение возбудителя методом ПЦР проводилось с использованием наборов реагентов производства «АмплиСенс» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) и оборудования, включающего многоканальный амплификатор ДНК «Терцик» (ДНК-Технология, Москва) с компьютером и программным обеспечением. Определение специфических антител классов IgG и IgM в сыворотке крови к цитомегаловирусу проводилось иммуноферментным методом с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск.

Экспрессию мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток периферической крови CD3, CD4, CD8, CD20, CD3⁺CD28⁻, CD3⁺CD28⁺, CD3⁻CD28⁺, CD20⁺CD40⁺, CD28, CD40 определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «Beckman Coulter» EpicsXLII. Типирование лимфоцитов проводили с помощью моноклональных антител к кластерам дифференцировки CD3, CD4, CD8, CD20, CD3⁺CD28⁻, CD3⁺CD28⁺, CD3⁻CD28⁺, CD20⁺CD40⁺, CD28, CD40 фирмы Immunotech (Франция).

Статистическая обработка данных. Анализ корреляций 3 признаков осуществлен графическим методом — карты линий уровня. Были также применены нелинейные методы, метод классификаций, дискриминантный анализ с оценкой точности, чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного результата.

Для анализа многомерных нелинейных зависимостей использовали пакет PolyAnalyst 3.5 Pro, который позволяет от одновременного рассмотрения многих переменных перейти к рассмотрению синтезированной переменной в целях разделения двух групп.

Результаты

Характеристика клинических симптомов ЦМВИ у новорожденных. В ходе проведенного исследования нами было показано, что при ЦМВИ в ряде случаев (16,3%) обнаружение вируса и постановка диагноза имели место в возрасте старше 1 месяца. В то же время уже на первом месяце жизни у детей отмечалась клиническая симптоматика, которая носила неспецифический характер (табл.).

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей о том, что отрицательный результат обследования ПЦР, полученный в первые дни жизни, не исключает возможности отсроченной реализации внутриутробной ЦМВИ [3, 4].

Графический метод анализа уровня Т-лимфоцитов и молекул костимуляции CD28 (карты линий уровня) в исследуемых группах. Так как в настоящее время считается, что для активации лимфоидных клеток необходим целый ряд взаимодействий с костимулирующими молекулами, нами изучены молекулы костимуляции CD28. При Т-зависимом иммунном ответе происходит постепенное изменение класса преобладающих специфических антител в сторону доминирования IgG.

При анализе трехмерных графиков поверхностей (рис. 1А, Б, III обложка), отражающих зависимости между уровнем Т-лимфоцитов CD3, CD28 и молекулами костимуляции CD3⁺CD28⁺ в контрольной и основной группах детей выявлены определенные тенденции. В основной группе, (при позднем обнаружении ДНК ЦМВ) уровень CD3⁺CD28⁺ имеет прямо пропорциональную зависимость от уровня CD3⁺ и не зависит от уровня CD28. Максимальные значения CD3⁺CD28⁺ (70–80%) зарегистрированы при CD3 в диапазоне от 85 до 90%. В то же время при ЦМВИ в случае раннего выявления ДНК ЦМВ (контрольная группа) максимальный уровень CD3⁺CD28⁺ ассоциировался с пониженным уровнем CD3⁺ (45–55%) и высоким уровнем CD28 (выше 3%).

В основной группе (при позднем обнаружении ДНК ЦМВ) максимальный уровень CD3⁺CD28⁺ отмечен при максимальных значениях CD3 и CD28. У детей с ЦМВИ при раннем выявлении ДНК ЦМВ (контрольная группа) максимальный уровень CD3⁺CD28⁺ отмечен при минимальных показателях CD3 и средних значениях CD28. Таким образом, обнаружены противоположные зависимости между уровнями CD3 и CD3⁺CD28⁺: в контрольной группе детей между уровнями CD3 и CD3⁺CD28⁺ наблюдалась отрицательная зависимость, в основной группе между данными параметрами выявлен положительный характер зависимости.

Для исследования взаимосвязи уровня Т-лимфоцитов с рецепторами CD3⁻CD28 от уровня Т-лимфоцитов с рецепторами CD3, CD28 был также использован графический метод анализа данных — карты линий уровня (рис. 2А, Б, III обложка). Выявлено, что максимальные значения CD3⁻CD28 зарегистрированы при максимальных значениях CD28, при этом диапазон величин CD3 определялся в пределах 65–75% в основной группе.

У детей контрольной группы максимальные значения CD3⁻CD28 ассоциированы с максимальным уровнем CD3 (75%), при этом не выявлено влияния уровня CD28 на содержание CD3⁻CD28.

Анализ трехмерных диаграмм (рис. 3А, Б, III обложка) влияния уровня CD3 на уровень Т-лимфоцитов, не экспрессирующих молекулу CD28 (CD3⁺CD28⁻), в зависимости от уровня молекул CD28 выявил тенденцию приближе-

Таблица. Характеристика и частота клинических симптомов у детей с цитомегаловирусной инфекцией на первом месяце жизни

Table. Characteristics and frequency of clinical symptoms in children with cytomegalovirus infection in the first month of life

Клинические симптомы Clinical symptoms	Группы				
	ЦМВИ, тяжелая форма CMVI, severe form (1.1) n = 67		ЦМВИ, среднетяжелая форма CMVI, medium-weight form (1.2) n = 80		
	n	% от группы % of group	n	% от группы % of group	p*
Одышка Dyspnea	45	67,2	9	11,3	0,0001
Тахикардия Tachycardia	44	65,7	14	17,5	0,0001
Сосудистая дезадаптация Cardiovascular deconditioning	58	86,6	38	47,5	0,0001
Лихорадка Fever	20	29,9	21	26,3	0,7
Менингоэнцефалит Meningoencephalitis	9	13,4	0	0	0,0001
Геморрагический синдром Hemorrhagic syndrome	16	23,9	4	5,0	0,001
Конъюгационная желтуха Conjugated jaundice	23	34,3	32	40,0	0,5
Увеличение печени Hepatomegalia	38	56,7	15	18,8	0,0001
Гипербилирубинемия Hyperbilirubinemia	22	32,8	26	32,5	1,0
Гепатит Hepatitis	10	14,9	6	7,5	0,1
Лимфаденит Lymphadenitis	5	7,5	5	6,3	1,0
Пневмония Pneumonia	36	53,7	5	6,3	0,0001
Ринофарингит Nasopharyngitis	30	44,8	30	37,5	0,03
Везикулярная сыпь Vesicular exanthem	5	7,5	9	11,3	0,5
Аллергодерматит Allergodermia	16	23,8	16	20,0	0,7
Конъюнктивит Conjunctivitis	9	13,4	0	0	0,0006
Гипотрофия Hypotrophy	33	49,2	22	27,5	0,01

Примечание: *p — статистически значимые различия с показателями больных группы 1.1.

Note: *p — a statistically significant difference with the rates of patients with of group 1.1.

ния к максимальному значению CD3⁺CD28⁻ в группе детей с поздним обнаружением ДНК ЦМВ (основная) при средних значениях CD3 (65–70%) и максимальных значениях CD28, не связанных с Т-лимфоцитами (CD3). Это свидетельствует об отсутствии взаимодействия CD28 с CD80/86 и активации Т-клеток, в то время как в контрольной группе количество Т-лимфоцитов, не связанных с CD28, соответствует более высокому уровню (75%) Т-лимфоцитов (CD3) и стремлению к минимуму относительного уровня молекул CD28.

С целью расчета точного прогноза наличия ЦМВИ у новорожденных с неспецифическими клиническими симптомами, рожденных у матерей с хроническими гинекологическими заболеваниями, при отрицательном результате ДНК диагностики методом ПЦР мочи и крови на первом месяце жизни применялся анализ многомерных нелинейных зависимостей с помощью пакета «PolyAnalyst 3.5. Pro». В результате были получены прогностические формулы и классификационная таблица 2 x 2 (четырёхпольная), на основе которой были рассчитаны параметры специфичности, чувствительности и точности диагностического прогноза, а также прогностическая ценность положительного результата (positive predictive value), характеризующая вероятность наличия заболевания при положительном результате теста.

На старте исследования учитывались следующие 10 показателей: CD3, CD4, CD8, CD20, CD3⁺CD28⁻, CD3⁺CD28⁺, CD3⁻CD28⁺, CD20⁺CD40⁺, CD28, CD40. Процедура отсеивания позволила обнаружить статистически значимые для прогноза наличия ЦМВИ факторы: CD3, CD3⁺CD28⁺, CD40.

В общем виде формула зависимости диагноза ЦМВИ от показателей CD3, CD3⁺CD28⁺, CD40 выглядела следующим образом.

– если выполняется неравенство $CD3 < 69,97$, применяется прогностическая формула $[0,008 \times CD40 \times (CD3^+/28^+) - 0,079 \times (CD3^+/28^+) + 0,726]/(CD40 - 7,332)$; прогноз ЦМВИ у новорожденных при первичном отрицательном результате ДНК-диагностики достоверен при значении предсказывающего выражения $> 0,467$;

– если выполняется неравенство $CD3 \geq 69,97$, применяется прогностическая формула $(0,807 \times CD40 - 0,081)/(CD40 - 7,332)$; прогноз ЦМВИ при отрицательном результате ДНК-диагностики достоверен при значении предсказывающего выражения $> 0,467$ ($p < 0,00001$).

Точность прогноза 89%, чувствительность метода — 64,5%, специфичность — 96,7%. Прогностическая ценность положительного результата — 87%.

Обсуждение

На основании полученных данных можно сделать следующее заключение о некоторой условности понятия «нормы» исследуемых иммунологических параметров: изолированная интерпретация любого параметра приводит к ошибочным выводам; компетентность иммунной системы может быть адекватно оценена путем синтетического анализа иммунологических маркеров.

При ЦМВИ у новорожденных при позднем обнаружении ДНК ЦМВ происходит активация Т-лимфоцитов и связывание их с костимулирующей молекулой CD3⁺CD28⁺, в связи с чем количество Т-лимфоцитов (CD3) снижается в сравнении с контрольной группой. Наличие активированных клеток CD3⁺CD28⁺, через которые осуществляется взаимодействие с молекулой CD80/CD86, необходимо для установления связи с липидной киназой, передающей активационные сигналы. Без них оказываются недостаточно действенными каскады реакций, завершающиеся активацией цитокиновых генов, в первую очередь — IL-2 (Ярилин А.А., 1999.; Ройт А., 2000).

В контрольной группе (дети с ранним обнаружением ДНК ЦМВ) количество Т-лимфоцитов, не связанных с CD28, (CD3⁺CD28⁻), соответствует более высокому, чем в группе детей с поздним обнаружением ДНК ЦМВ, уровню (75%) Т-лимфоцитов (CD3) и стремлению к минимуму относительного уровня молекул CD28. Это свидетельствует об отсутствии взаимодействия CD28 с CD80/86 и активации Т-клеток.

Данный факт объясняется увеличением доли активированных клеток CD3⁺CD28⁺ (рис. 1Б, III обложка) при ЦМВИ и является хорошим прогностическим признаком. Отсутствие взаимодействия CD28 с CD80/CD86 вследствие недостаточной выработки IL-2 ослабляет активацию Т-клеток и обуславливает анемию.

Примененная визуализация зависимости параметров в пространстве трех переменных позволяет предположить наличие ЦМВИ у пациента в случаях позднего обнаружения ДНК ЦМВ в крови и в моче.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что Т-лимфоциты с маркерами активации CD3⁺CD28⁺, через которые в клетку проводятся костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-хелперов, являются одним из статистически значимым для постановки диагноза фактором. Дефицит CD28 молекул, который приводит к отмене костимулирующего сигнала и анергии Т-лимфоцитов, носит негативный

характер и способствует развитию иммунологической недостаточности при ЦМВИ у новорожденных. Полученные результаты исследования подтвердили важность контактного взаимодействия иммунокомпетентных клеток между собой и с другими клетками организма для осуществления противовирусного иммунного ответа организма на внедрение цитомегаловируса у детей первых месяцев жизни.

Несмотря на то, что эти изменения носят неспецифический характер, они являются значимыми для врача-педиатра и позволяют выделять детей группы риска, которым необходимо в обязательном порядке провести повторное обследование мочи на ПЦР для обнаружения ДНК ЦМВ в течение первых трех месяцев жизни, независимо от результатов первичного анализа и назначить превентивную терапию антицитомегаловирусным иммуноглобулином «Неоцитотект».

Выводы

Полученная статистическая модель позволяет прогнозировать наличие ЦМВИ у новорожденных с неспецифической клинической симптоматикой, родившихся у матерей с хроническими воспалительными гинекологическими заболеваниями, в случаях позднего обнаружения ДНК ЦМВ в крови и в моче и имевших на 1 месяце отрицательный результат ДНК-диагностики, с точностью 89%.

Прогноз ЦМВИ, не подтвержденной еще на первом месяце жизни ДНК-диагностикой, делает возможным своевременное начало специфической терапии, следуя предписанным терапевтическим протоколам.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Карпова А.Л., Нароган М.В., Карпов Н.Ю. Врожденная цитомегаловирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2017. Т. 62, № 1. С. 10–18. [Karpova A.L., Narogan M.V., Karpov N.Yu. Congenital cytomegalovirus infection: diagnosis, treatment, and prevention. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2017, no. 1, pp. 10–18. (In Russ.)]
2. Кистенева Л.Б. Роль цитомегаловирусной инфекции в формировании перинатальной патологии // Детские инфекции. 2013. № 3. С. 44–47. [Kisteneva L.B. The role of cytomegalovirus infection in the formation of perinatal pathology. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2013, no. 3, pp. 44–47. doi: 10.22627/2072-8107-2013-12-3-40-43 (In Russ.)]
3. Клинические рекомендации (протоколы) по неонатологии. Под ред. Д.О. Иванова. СПб.: Информ-Навигатор, 2016. 464 с. [Clinical recommendations (protocols) for neonatology. Ed. D.O. Ivanov. *St. Petersburg: Inform-Navigator*, 2016. 464 p. (In Russ.)]
4. Кравченко Л.В. Уровень цитокинов при Эпштейн–Барр вирусной инфекции у новорожденных и детей первых месяцев жизни // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 2. С. 79. [Kravchenko L.V. Level of cytokines at children in first months of life with the infection caused by the Epstein–Barr virus. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Contemporary Problems of Science and Education*, 2017, no. 2, p. 79. (In Russ.)]
5. Кравченко Л.В., Афонин А.А., Демидова М.В. Нарушение иммунной системы при герпесвирусной инфекции // Детские инфекции. 2012. Т. 11, № 1. С. 33–37. [Kravchenko L.V., Afonin A.A., Demidova M.V. Infringements of immune system at herpes virus infection. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 33–37. (In Russ.)]
6. Кравченко Л.В., Левкович М.А. Механизмы иммуносупрессии при частых острых респираторно-вирусных инфекциях у детей, перенесших цитомегаловирусную инфекцию в периоде новорожденности // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 3. С. 34–38. [Kravchenko L.V., Levkovich M.A. Mechanisms of immunosuppression upon frequent acute viral respiratory infections in infants after neonatal cytomegalovirus infection. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. VICH infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, iss. 3, pp. 34–38. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-3-34-38 (In Russ.)]
7. Кравченко Л.В., Левкович М.А., Пятикова М.В. Роль полиморфизма гена интерферона γ и интерферонпродукции в патогенезе инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа у детей раннего возраста // Клиническая лабораторная диагностика. 2018. Т. 63, № 6. С. 357–361. [Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Pyatikova M.V. The role of polymorphism of the interferon gene γ and interferonoproduction in the pathogenesis of infection caused by herpes 6 type virus in children of early age. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2018, vol. 63, no. 6, pp. 357–361. (In Russ.)]
8. Краснов В.В., Обрядина А.П. Клинико-лабораторная характеристика цитомегаловирусной инфекции у детей // Практическая медицина. 2012. Т. 62, № 7. С. 137–139. [Krasnov V.V., Obryadina A.P. Clinical laboratory characteristics of cytomegalovirus infection in children. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2012, vol. 62, no. 7, pp. 137–139. (In Russ.)]
9. Любошенко Т.М., Долгих Т.И. Клинико-иммунологическая характеристика больных с герпесвирусной инфекцией различной тяжести // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 359–364. [Lyuboshenko T.M., Dolgikh T.I. Clinical and immunological characteristics of patients with herpes infections of varying severity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 359–364. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-359-364 (In Russ.)]
10. Мангушева Я.Р., Хаертынова И.М., Мальцева Л.И. Цитомегаловирусная инфекция у детей // Практическая медицина. 2014. Т. 83, № 7. С. 11–14. [Mangusheva Ya.R., Khaertynova I.M., Maltseva L.A. Cytomegalovirus infection in children. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2014, vol. 83, no. 7, pp. 11–14. (In Russ.)]

11. Сомова Л.М., Беседнова Н.Н., Плехова Н.Г. Апоптоз и инфекционные болезни // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 303–318. [Somova L.M., Besednova N.N., Plekhova N.G. Apoptosis and infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 303–318. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-303-318 (In Russ.)]
12. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 740 с. [Yarilin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 740 p. (In Russ.)]
13. Visentin S., Manara R., Milanese L., Da Roit A., Forner G., Salviato E., Citton V., Magno F.M., Orzan E., Morando C., Cusinato R., Mengoli C., Palu G., Ermani M., Rinaldi R., Cosmi E., Gussetti N. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 55, no. 4, pp. 497–503. doi: 10.1093/cid/cis423

Автор:

Кравченко Л.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела педиатрии НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Поступила в редакцию 22.09.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 18.03.2019

Author:

Kravchenko L.V., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Pediatric, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Received 22.09.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 18.03.2019

ЭКСПРЕССИЯ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА Т-ХЕЛПЕРАХ КРОВИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С *HELICOBACTER PYLORI*: ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРОДУОДЕНИТЕ И ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, О.Н. Бабайкина

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Резюме. *Helicobacter pylori* вызывает хроническую инфекцию приблизительно у половины населения планеты. Проявления инфекции, вызываемой этим микроорганизмом, варьируют от бессимптомного инфицирования до гастрита и язвенной болезни. Предполагается, что манифестные формы этой инфекции ассоциированы с утратой иммунорегуляции и усилением провоспалительного клеточного иммунного ответа, индукторами которого являются специфические к *H. pylori* Т-хелперы. В этой работе мы оценивали степень зрелости CD4⁺ Т-лимфоцитов крови и экспрессию на них хемокиновых рецепторов, участвующих в миграции в желудочно-кишечный тракт (CCR9 и CCR6), Т- и В-клеточные зоны лимфоидных органов (CCR7 и CXCR5). Показано, что при манифестных формах *H. pylori*-инфекции наблюдается изменение экспрессии хемокиновых рецепторов на Т-хелперах, которое зависит от формы заболевания. При хроническом гастродуодените в крови увеличивается содержание зрелых CD4⁺CD45RO⁺ клеток с рецептором CCR9, и незрелых CD4⁺CD45RO⁻ клеток, несущих рецептор CXCR5. При сочетании хронического гастродуоденита с язвенной болезнью наблюдается усиление активации зрелых Т-хелперов, что проявляется в увеличении количества CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ клеток. Также у этих пациентов увеличивается содержание зрелых Т-хелперов, несущих рецептор CCR6 (в основном за счет наиболее зрелых CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻CCR6⁺ клеток) и клеток с фенотипом фолликулярных Т-хелперов, появляется минорная группа CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR6⁺ клеток. В то же время у пациентов с язвенной болезнью отсутствует увеличение количества CD4⁺CCR9⁺ лимфоцитов в крови. Полученные данные свидетельствуют о различиях в управлении тканеспецифической миграцией Т-хелперов при данных заболеваниях.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, рецепторы хемокинов, язвенная болезнь, гастрит, дуоденит.

Адрес для переписки:

Талаев Владимир Юрьевич
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Contacts:

Vladimir Yu. Talayev
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Библиографическое описание:

Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Заиченко И.Е., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Бабайкина О.Н. Экспрессия хемокиновых рецепторов на Т-хелперах крови при заболеваниях, ассоциированных с *Helicobacter pylori*: хроническом гастродуодените и язвенной болезни // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 295–303. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-295-303

Citation:

Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.Ye., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Babaykina O.N. Chemokine receptor expression on peripheral blood T-helper cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases: chronic gastroduodenitis and peptic ulcer disease // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 295–303. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-295-303

CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION ON PERIPHERAL BLOOD T-HELPER CELLS IN *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED DISEASES: CHRONIC GASTRODUODENITIS AND PEPTIC ULCER DISEASE

Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.Ye., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Babaykina O.N.

I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. *Helicobacter pylori* represents a pathogen causing chronic infection in around a half of the global human population, which manifestations vary from asymptomatic infection to developing gastritis and peptic ulcer. The data accumulated suggest that overt clinical types of this infection are associated with lost immunoregulation and increased pro-inflammatory cell-mediated immune response triggered by *H. pylori*-specific T helper cells. Here, we examined the degree of peripheral blood CD4⁺ T cell maturity and related expression of chemokine receptors involved in migration to gastrointestinal tract (CCR9 and CCR6), as well as T- and B-cell zones of lymphoid organs (CCR7 and CXCR5). It was shown that overt *H. pylori*-infection was coupled to changes in expression pattern of chemokine receptors on T helper cells. In particular, percentage of mature CD4⁺CD45RO⁺ T cells bearing CCR9 and immature CD4⁺CD45RO⁻ T cells expressing CXCR5 was increased in peripheral blood of patients with chronic gastroduodenitis. However, increased amount of activated mature CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ T cells was observed in patients with chronic gastroduodenitis comorbid with peptic ulcer that was also associated with elevated amount of mature CCR6⁺ T helpers (mainly CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻CCR6⁺ cells) and follicular T helper cells as well as emerging minor CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR6⁺ T cell subset, not affecting CD4⁺CCR9⁺ T cells. Thus, the data obtained evidence that tissue-specific T-helper cell migration is controlled separately in of *H. pylori*-associated diseases.

Key words: T lymphocytes, chemokine receptors, peptic ulcer disease, gastritis, duodenitis.

Введение

Helicobacter pylori — грамтрицательная спиралевидная подвижная микроаэрофильная бактерия, способная персистировать в желудке и на участках желудочной метаплазии в двенадцатиперстной кишке человека. *H. pylori* является одним из наиболее важных этиологических факторов развития гастрита и язвенной болезни, а также провоцирует развитие аденокарциномы желудка и лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми желудка, однако у 85% зараженных этот микроорганизм вызывает длительное бессимптомное инфицирование [7, 15, 20]. Длительная персистенция *H. pylori* в желудке, по-видимому, обусловлена особенностью этого биотопа, разнообразием зон размножения микроорганизма и регуляторным действием его факторов патогенности на иммунную систему [15, 18, 23]. При инфицировании, подвижный и продуцирующий муколитические ферменты *H. pylori* внедряется в слой слизи, покрывающий эпителий желудка, и размножается в этом защитном слое. Около 20% микроорганизмов адгезируется на апикальной поверхности эпителия, а также проникает в железы желудка и использует эти зоны как дополнительные репликативные ниши. При этом контактные и секреторируемые токсины *H. pylori* повреждают эпителиальные клетки, что приводит к нарушению секреции HCl и продукции провоспалительных цитокинов. Уже через 2 недели после инфицирования

добровольцев наблюдаются признаки иммунного ответа и воспаления: инфильтрация слизистой желудка лейкоцитами, локальный рост продукции IL-1, IL-6 и IL-8, появление антител к *H. pylori* в крови [10, 24]. Несмотря на быстрое развитие, иммунный ответ оказывается недостаточно эффективным для устранения инфекции. Гуморальный иммунный ответ не оказывает значительного действия на *H. pylori*, поскольку репликативные ниши микроорганизма недоступны для IgM и IgG, а малое количество полимерного иммуноглобулинового рецептора в желудке и связанный с этим недостаток секреции IgA не позволяет полностью устранить *H. pylori* с поверхности эпителия [23]. Провоспалительный клеточный иммунный ответ, по-видимому, сдерживает размножение *H. pylori*, но при этом вносит решающий вклад в развитие симптомов гастрита [15]. По крайней мере, заражение хеликобактером мышей с отсутствием Т-лимфоцитов или антигенспецифических Т-хелперов вызывает пожизненную массивную, но бессимптомную инфекцию, тогда как введение этим мышам нормальных Т-хелперов вызывает уменьшение бактериальной нагрузки и, в то же время, развитие острого гастрита [8, 11].

С течением времени характер иммунного ответа изменяется, и провоспалительный компонент компенсируется растущей активностью регуляторных Т-клеток (Treg). В результате воспаление переходит на стабильно слабый уровень, симптомы острого гастрита исче-

зают, и у большинства пациентов инфекция становится бессимптомной на годы или десятилетия [23]. Нарушение равновесия в системе «микроорганизм — сдерживающий его провоспалительный иммунный ответ — противовоспалительная регуляторная реакция» ведет к усилению воспаления и развитию хронического гастрита и дуоденита. Нарушение баланса секреции защитных и агрессивных факторов в желудке в сочетании с высокой ферментативной активностью *H. pylori* у отдельных пациентов приводят к локальному разрушению защитного слоя слизи, повреждению слизистой желудочным соком и токсинами микроба и формированию язвы.

При персистентной *H. pylori*-инфекции и хроническом воспалении слизистая желудка инфильтрирована Т- и В-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, эозинофильными и нейтрофильными гранулоцитами, тучными клетками и дендритными клетками (DC), причем Т-, В-лимфоциты и DC организованы в лимфоидные фолликулы, что свидетельствует о постоянной антигенной презентации [28]. Основными индукторами воспаления являются IL-17A и, особенно, IFN γ , который при *H. pylori*-инфекции продуцируется различными типами клеток [11]. При этом, продукция IFN γ зависит от IL-17A — ключевого цитокина Т-хелперов-17 (Th17) [26], и от IL-23 [6] — цитокина дендритных клеток, основной функцией которого является стимулирование Th17 [13]. Кроме того, продукция IFN γ , IL-17A и развитие воспаления в модели *H. pylori*-инфекции у мышей нуждается в IL-21 — цитокине, который продуцируют фолликулярные Т-хелперы (Tfh), а также Th17 и NKT-клетки [5], причем у инфицированных мышей наблюдается накопление Tfh в мезентериальных лимфатических узлах и lamina propria желудка [17]. Таким образом, в провоспалительном клеточном иммунном ответе на *H. pylori* могут синергично участвовать не только «профессиональные» стимуляторы воспаления: Th17 и различные IFN γ -продуцирующие клетки, но и Tfh, основной функцией которых является стимуляция гуморального иммунного ответа [19].

Для реализации своих провоспалительных функций перечисленные выше клетки должны проникнуть в инфицированную слизистую. Вовлечение наивных Т-хелперов в иммунный ответ и их дифференцировка в зрелые эффекторы происходит во вторичных лимфоидных органах. В частности, в ходе дифференцировки происходит изменение набора адгезивных молекул и хемокиновых рецепторов, что приводит к передислокации созревших Т-лимфоцитов в зону выполнения их специфических функций, причем в лимфоидных органах, ассоциированных с определенным типом ткани, Т-лимфоциты могут получать специфический набор молекул, способствующий их миграции в соответствующий тип ткани. Так, при *H. pylori*-инфекции у мышей способность к миграции в желудочно-кишечный тракт приобретают Т-лимфоциты, вовлеченные в иммунный ответ в Пейеровых бляшках тонкого кишечника. Соответственно, у мышей, лишенных Пейеровых бляшек, развивается массивная *H. pylori*-инфекция без существенного воспаления и клеточной инфильтрации желудка, несмотря на генерацию провоспалительных *H. pylori*-специфичных Т-хелперов [14]. В данной работе в крови у пациентов с язвенной болезнью желудка и хроническим гастродуоденитом, ассоциированными с *H. pylori*-инфекцией, исследовали содержание и степень зрелости Т-хелперов с хемокиновыми рецепторами CCR6, CCR9, CCR7 и CXCR5, участвующими в миграции в лимфоидные органы или в слизистую желудочно-кишечного тракта. CCR7 отвечает за миграцию наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти в Т-клеточные зоны лимфоидных органов и утрачивается в ходе их дифференцировки в эффекторы. CXCR5 экспрессируется на В-лимфоцитах и Tfh и обеспечивает встречу этих клеток в В-клеточной зоне лимфоидных органов при запуске гуморального иммунного ответа [19]. Рецептор CCR6, участвует в миграции Т-лимфоцитов в кожу и желудочно-кишечный тракт, где продуцируется его лиганд — хемокин CCL20 [30]. В норме в желудочно-кишечном тракте CCL20 продуцируется в Пейеровых бляшках, а при патологии — также в воспаленной слизистой [29]. Рецептор CCR9 участвует в миграции Т-лимфоцитов в желудочно-кишечный тракт, преимущественно в тонкий кишечник, в слизистой которого продуцируется лиганд рецептора — хемокин CCL25 [16, 29].

Материалы и методы

Обследовали взрослых больных с манифестными формами *H. pylori*-инфекции (N = 17, возраст от 32 до 57 лет, средний возраст 48,5 лет) и взрослых практически здоровых доноров группы сравнения (N = 12, возраст от 28 до 55 лет, средний возраст 40,6 лет). Больные с *H. pylori*-инфекцией разделялись на 2 группы в зависимости от клинических проявлений заболевания. Первую группу больных составляли пациенты с язвенной болезнью (N = 8, возраст от 32 до 57 лет, средний возраст 45,7 лет). Все пациенты этой группы страдали заболеваниями желудка и/или двенадцатиперстной кишки в течение 7–20 лет и наряду с диагнозом язвенной болезни имели диагнозы хронического гастрита и хронического дуоденита. Язвы были локализованы в двенадцатиперстной кишке

(5 человек), в антруме желудка (2) и в средней трети тела желудка (1). Сопутствующими заболеваниями были: хронический холецистит (5 пациентов), хронический панкреатит (5), гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (4). Вторую группу составляли пациенты с диагнозом хронического гастрита и хронического дуоденита (далее — гастродуоденит) без признаков атрофии слизистой и без язвенной болезни (N = 9, возраст от 45 до 55 лет, средний возраст 50,4 года). Сопутствующими заболеваниями были: рефлюкс-эзофагит (2 человека) и дуоденогастральный рефлюкс (3 человека).

Больные обследовались при поступлении в стационар в связи с обострением основного заболевания. Исследование проводилось до начала лечения. Наличие *H. pylori*-инфекции у всех больных было подтверждено с помощью быстрого уреазного теста и обнаружения ДНК *H. pylori* полимеразой цепной реакцией, как это описано ранее [1]. Для определения фенотипа Т-лимфоцитов с помощью проточной цитометрии применяли панели антител и стратегию гейтирования, использованные нами ранее [3]. Для этого клетки крови больных обеих групп и доноров группы сравнения окрашивались ме-

ченными моноклональными антителами к молекулам CD4 (Сорбент, Москва, Россия), CD45RO, CCR6, CCR9 (eBiosciences, США), CCR7, CXCR5 и ICOS (eBiosciences, США). Затем лизировали эритроциты раствором BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США), клетки отмывали и фиксировали 1% параформальдегидом. Анализ проводили на лазерном проточном цитофлуориметре FacsCalibur (BD Biosciences, США), последовательно гейтируя лимфоциты, CD4⁺ лимфоциты, CD45RO⁻ и CD45RO⁺ Т-клетки. Затем рассчитывали количество клеток, несущих комбинации исследуемых маркеров, как долю (%) от общего количества лимфоцитов. Результаты цитометрии обрабатывали с помощью программы CellQuest (BD Biosciences, США). Статистический анализ проводили с использованием критерия Ньюмена–Кейлса (при множественном сравнении) и t-теста Стьюдента (при сравнении здоровых доноров с общей группой больных). Данные представлены в виде M±m. Достоверность отличий на рисунках отмечена по критерию Ньюмена–Кейлса.

Результаты

Исследовали фенотип Т-хелперов крови и экспрессию на них хемокиновых рецепторов у пациентов с язвенной болезнью в сочетании с хроническим гастродуоденитом (далее — группа с язвенной болезнью) и у пациентов с хроническим гастродуоденитом без язвенной болезни (далее — группа с гастродуоденитом). Содержание CD4⁺ лимфоцитов при этих формах *H. pylori*-инфекции не изменяется (рис. 1А). Содержание зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперов увеличивается незначительно (рис. 2А), и достоверный прирост количества этих клеток выявляется только при сравнении группы здоровых доноров с общей группой больных с *H. pylori*-инфекцией (21,9±1,7% CD4⁺CD45RO⁺ клеток у здоровых и 27,6±2,3% у больных; p = 0,03 в t-тесте).

Существенные отличия больных с язвенной болезнью от пациентов с гастродуоденитом и здоровых доноров были обнаружены при анализе экспрессии индуцибельного рецептора костимулирующего сигнала ICOS. При язвенной болезни наблюдался значительный рост содержания CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ Т-клеток, тогда как при гастродуодените без язвенной болезни увеличения количества ICOS⁺ Т-хелперов не обнаружено (рис. 1Б).

Оценка экспрессии хемокиновых рецепторов показала, что рецептор CCR6 в норме и при исследуемых патологиях экспрессируется исключительно на зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперах (рис. 2). У больных с язвенной болезнью наблюдается значительный рост со-

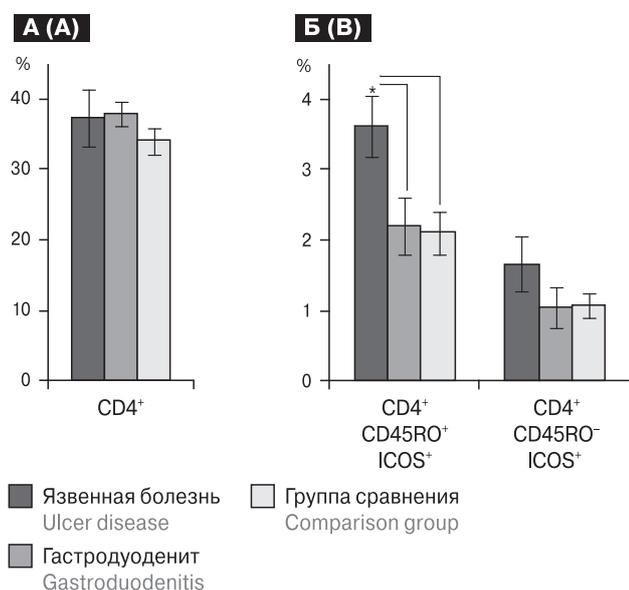


Рисунок 1. Содержание CD4⁺ лимфоцитов (А), CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ и CD4⁺CD45RO⁻ICOS⁺ лимфоцитов (Б) в крови больных с язвенной болезнью, гастродуоденитом и у доноров группы сравнения (% от всех лимфоцитов)

Figure 1. Percentage of peripheral blood CD4⁺ T cell subsets (A), CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ and CD4⁺CD45RO⁻ICOS⁺ lymphocytes (B) detected in patients with peptic ulcer, gastritis and volunteers in comparison group (% of total lymphocytes)

Примечание. *Достоверные отличия при p < 0,05.

Note. *p < 0.05.

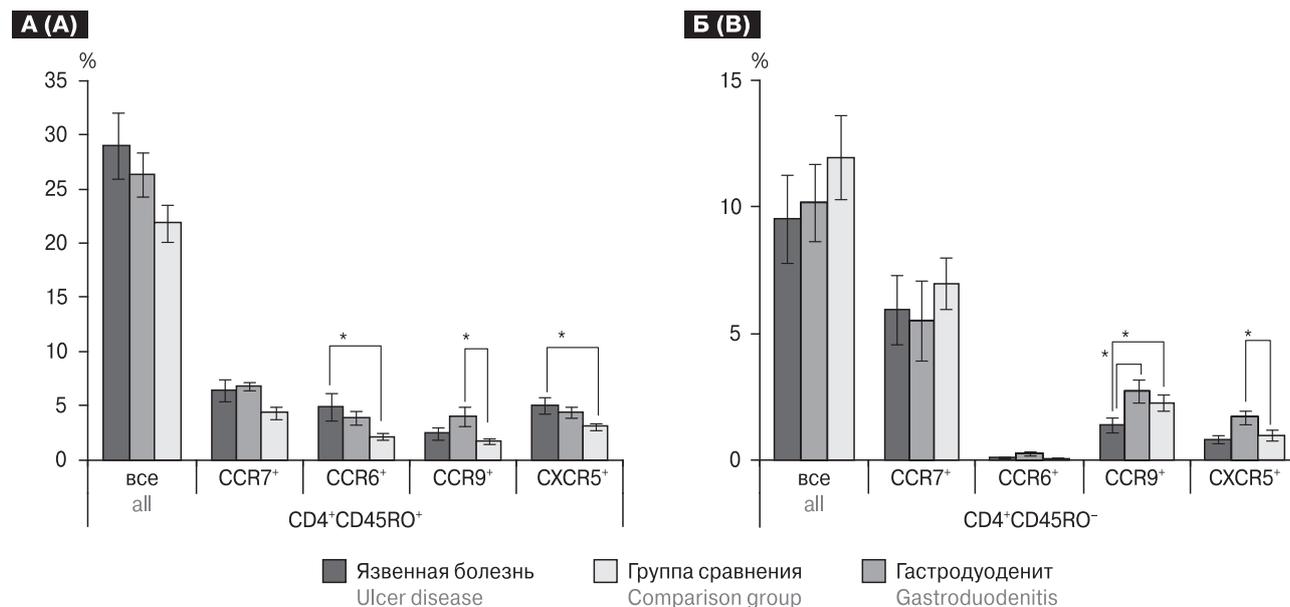


Рисунок 2. Содержание CD4⁺CD45RO⁺ (А) и CD4⁺CD45RO⁻ лимфоцитов (Б), экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR7, CCR6, CCR9 и CXCR5, в крови больных с язвенной болезнью, гастродуоденитом и у лиц группы сравнения (% от всех лимфоцитов)

Figure 2. Percentage of peripheral blood CD4⁺CD45RO⁺ (A) and CD4⁺CD45RO⁻ CD4⁺ T cell subsets expressing chemokine receptors CCR7, CCR6, CCR9 and CXCR5 in patients with peptic ulcer, gastroduodenitis and volunteers in comparison group (% of total lymphocytes)

Примечание. *Достоверные отличия при $p < 0,05$.

Note. * $p < 0.05$.

держания CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток, тогда как у больных с гастродуоденитом увеличение количества этих клеток менее выражено и статистически недостоверно (рис. 2А). Рост количества CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ лимфоцитов при язвенной болезни происходит, в основном, за счет наиболее зрелых клеток с фенотипом CCR7⁻ эффекторов/эффекторных Т-клеток памяти (рис. 3А). Их количество увеличивается в 2,4 раза или на 2,1% от общего количества лимфоцитов, что составляет 78,94% всего увеличения CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток. Содержание малой группы CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CCR7⁺ клеток также достоверно увеличивается в 2,6 раза или на 0,57% от общего количества лимфоцитов. Анализ экспрессии CCR6 и молекул ICOS на CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперах показывает, что при язвенной болезни активация равномерно затрагивает как CCR6⁻, так и CCR6⁺ Т-хелперы (12,95% активированных ICOS⁺ клеток в CCR6⁻ группе клеток и 12,94% — в CCR6⁺ группе). Результатом этого является достоверный рост количества ICOS⁺CCR6⁻ и появление в кровотоке малой группы ICOS⁺CCR6⁺ клеток (рис. 3Б).

В крови пациентов с язвенной болезнью наблюдается увеличение содержания CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток (рис. 2А). Анализ распределения молекул CCR7 и CXCR5 показывает, что увеличение экспрессии CXCR5 при

язвенной болезни происходит за счет наиболее зрелой группы клеток с фенотипом Tfh — CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR7⁻ (рис. 3В).

При гастродуодените достоверный рост содержания CXCR5⁺ клеток наблюдается в незрелой субпопуляции CD45RO⁻ Т-хелперов (рис. 2Б), тогда как в субпопуляции зрелых CD45RO⁺ Т-хелперов рост количества CXCR5⁺ клеток невелик и при множественном сравнении статистически недостоверен (рис. 2А).

Анализ распределения рецепторов CCR6 и CXCR5 свидетельствует, что большинство CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток и CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток представляют две различные группы Т-хелперов (рис. 3Г). В норме два этих рецептора практически не экспрессируются на одних и тех же клетках, но при язвенной болезни в крови появляется группа клеток, экспрессирующих эти рецепторы одновременно. Несмотря на свою малочисленность эти CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ клетки надежно определяются с помощью цитометрии (рис. 4). Учитывая набор хемокиновых рецепторов можно предположить, что эти клетки способны мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой кишечника.

При хроническом гастродуодените наблюдается существенный рост содержания зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, несущих ре-

цептор CCR9 (рис. 2А). При язвенной болезни количество $CD4^+CD45RO^+CCR9^+$ лимфоцитов не увеличивается, а количество $CD4^+CD45RO^-CCR9^+$ лимфоцитов достоверно снижается по сравнению с контрольной группой и группой больных с гастродуоденитом (рис. 2Б).

Обсуждение

Анализ фенотипа Т-клеток крови выявил небольшой прирост содержания зрелых $CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток при манифестных формах *H. pylori*-инфекции, причем у больных с язвенной болезнью, в отличие от больных с гастродуоденитом, наблюдался существенный рост количества зрелых Т-хелперов, экспрессирующих молекулу ICOS. Поскольку эта молекула

отсутствует на покоящихся Т-клетках и экспрессируется после стимуляции антигеном [12], рост количества ICOS⁺ клеток свидетельствует об интенсификации вовлечения Т-хелперов в иммунный ответ при язвенной болезни.

Также при язвенной болезни наблюдалось значительное увеличение содержания зрелых Т-хелперов, несущих рецептор CCR6, в основном за счет наиболее зрелых $CD4^+CD45RO^+CCR7^-CCR6^+$ клеток. При обсуждении этих результатов следует отметить связь экспрессии CCR6 с субпопуляцией Th17. Поскольку индукторами экспрессии гена CCR6 являются мастер-регуляторы созревания Th17 — ядерные факторы ROR γ t и PLZF [27], следует предположить, что зрелые CCR6⁺ Т-хелперы являются Th17 или клетками, вступавшими на путь

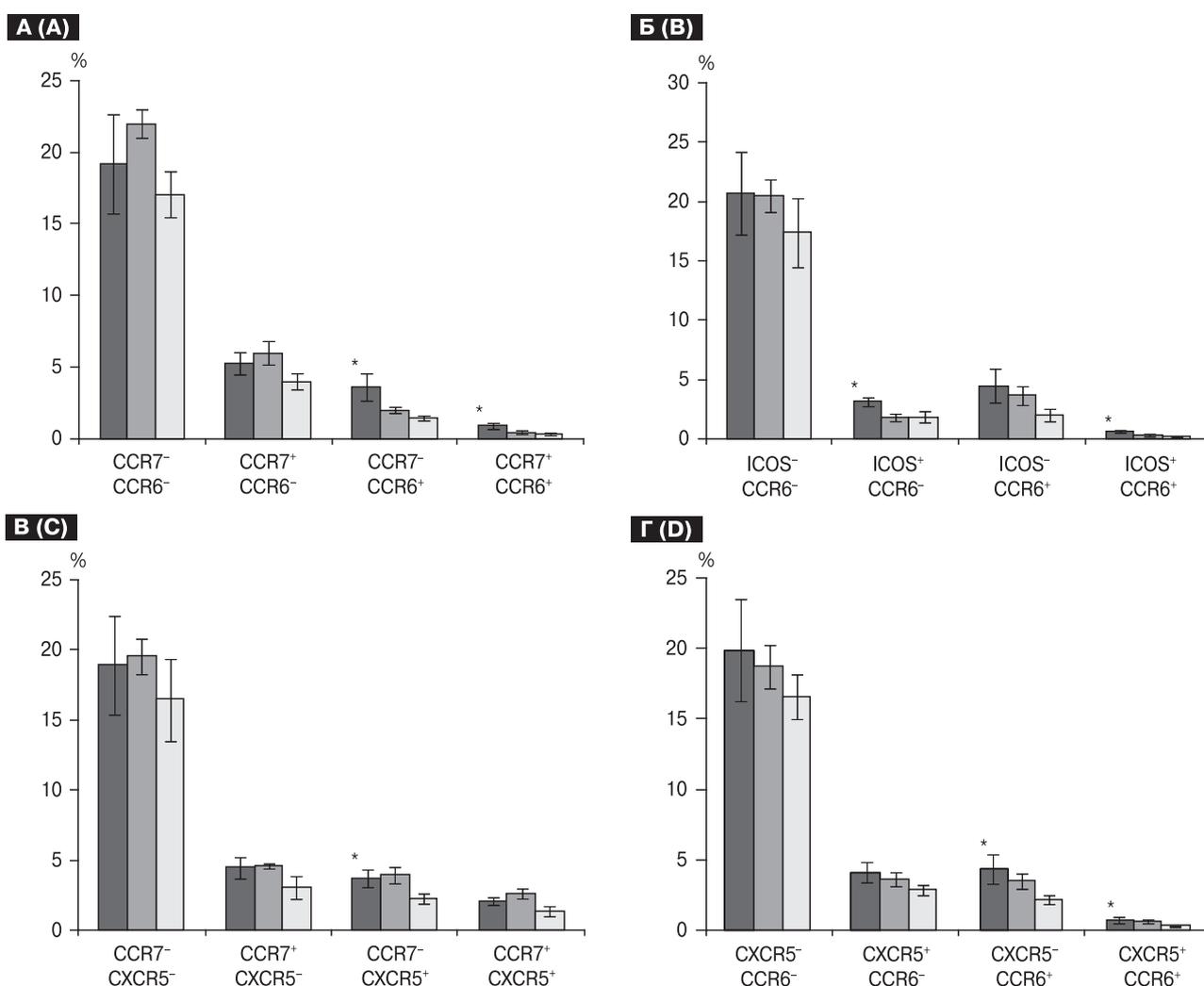


Рисунок 3. Содержание зрелых $CD4^+CD45RO^+$ лимфоцитов с различными наборами мембранных молекул при исследуемых заболеваниях (% от всех лимфоцитов крови)

Figure 3. Percentage of diverse peripheral blood mature $CD4^+CD45RO^+$ T cell subsets in patients with *H. pylori*-associated diseases (% of total lymphocytes)

Примечание. Набор анализируемых молекул — под гистограммами. *Достоверные отличия от группы сравнения при $p < 0,05$.

Note. Surface markers examined in the study are denoted in the plots. * $p < 0.05$.

созревания Th17, но изменившими направленные дифференцировки в силу пластичности. Таким образом, рост экспрессии CCR6 может отражать активизацию программы созревания Th17 при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией.

Еще одной группой клеток, увеличивающих свое содержание в крови при язвенной болезни, являлись лимфоциты с фенотипом Tfh, возможная роль которых в патогенезе *H. pylori*-инфекции обсуждалась во введении. При гастродуодените достоверного увеличения содержания Tfh не обнаружено, но в крови выявляется повышенное содержание CXCR5⁺ клеток с менее зрелым фенотипом: CD4⁺CD45RO⁻CXCR5⁺. Функциональный статус этих лимфоцитов при гастродуодените неизвестен, но в норме клетки с таким фенотипом практически не отличаются от типичных наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов [2].

При гастродуодените обнаружено существенное увеличение количества зрелых Т-хелперов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CCR9. Поскольку этот рецептор отвечает за миграцию Т-хелперов в слизистую тонкого кишечника [16, 29], увеличение содержания CCR9⁺ Т-хелперов в крови при гастродуодените представляется вполне ожидаемым проявлением усиления миграции лимфоцитов гематогенным путем в слизистую тонкого кишечника. Неожиданным оказалось отсутствие роста содержания CD4⁺CD45RO⁺CCR9⁺ лимфоцитов и достоверное уменьшение количества CD4⁺CD45RO⁻CCR9⁺ лимфоцитов у пациентов с язвенной болезнью, несмотря на то что все пациенты этой группы имели гастродуоденит в качестве сопутствующего заболевания.

Различия экспрессии CCR9 на циркулирующих Т-клетках может быть обусловлено балансом двух процессов — созреванием DC и синтезом all-trans ретиноевой кислоты (ПК), которая является индуктором экспрессии CCR9 [22]. Ретиноевая кислота образуется из поступающего с пищей витамина А в эпителии и в DC слизистых желудка и тонкого кишечника [4]. После созревания и миграции в лимфоидные органы эти DC будут снабжать контактирующие с ними Т-лимфоциты ретиноевой кислотой и тем самым индуцировать на них экспрессию CCR9. Как известно, воспаление усиливает созревание и миграцию DC. В то же время *H. pylori* способен угнетать синтез ПК в желудке [4], причем степень подавления синтеза ПК коррелирует с выраженностью воспаления [21]. В соответствии с этим можно предположить, что при гастродуодените индуцированная воспалением активность DC превалирует над ослаблением синтеза ПК, что приводит к усилению экспрессии CCR9 на Т-лимфоцитах, тогда как при яз-

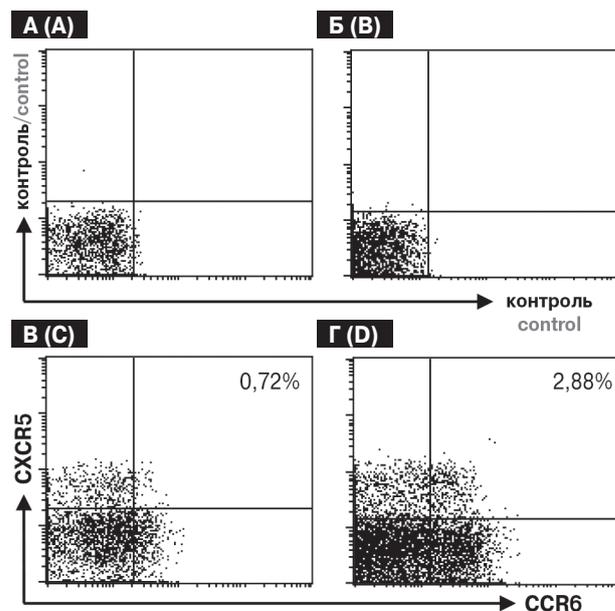


Рисунок 4. Экспрессия CCR6 и CXCR5 на CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитах у здорового донора (А, В) и больного с язвенной болезнью желудка (Б, Г)

Figure 4. Expression of CCR6 and CXCR5 on CD4⁺CD45RO⁺ T cells in representative volunteer (A, C) vs. patient with peptic ulcer disease (B, D)

Примечание. Верхний ряд — негативные контроли окрашивания. В верхнем правом квадранте обозначена доля CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ клеток от CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов.

Note. Top row — negative staining control. Upper right quadrant: a proportion of CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ cells gated on CD4⁺CD45RO⁺ T cells is indicated.

венной болезни мощное воспаление вызывает глубокое подавление синтеза ПК, что приводит к отмене индукции CCR9 на созревающих Т-хелперах.

По субпопуляционному составу CD4⁺CCR9⁺ лимфоциты, циркулирующие в крови здорового человека, являются весьма гетерогенной группой, которая, по сравнению с CD4⁺CCR9⁻ лимфоцитами, содержит повышенное количество активированных клеток, провоспалительных Th1 и противовоспалительных Treg [25]. У мышей CCR9 также экспрессируется на Т-клетках эффекторах и на Treg, причем в субпопуляции FoxP3⁺ Treg доля CCR9⁺ клеток больше, чем у эффекторов [9]. Таким образом, Treg могут вносить существенный вклад в изменения количества CCR9⁺ клеток при исследуемых патологиях, и для установления патофизиологического значения этих изменений необходимо провести дополнительные исследования баланса эффекторов и Treg в группе CCR9⁺ клеток при гастродуодените и язвенной болезни.

Заключение

При *H. pylori*-инфекции наблюдаются изменения экспрессии хемокиновых рецепторов Т-хелперов, зависящие от клинической формы заболевания. При хроническом гастродуодените в крови увеличивается содержание зрелых CCR9⁺ Т-хелперов и незрелых CD45RO⁻ Т-хелперов, несущих рецептор CXCR5. При язвенной болезни наблюдается усиление активации

зрелых Т-хелперов, увеличивается содержание зрелых CCR6⁺ Т-хелперов и клеток с фенотипом фолликулярных Т-хелперов, а также появляется минорная группа CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR6⁺ клеток. Роста экспрессии CCR9 на CD4⁺ Т-лимфоцитах при язвенной болезни не наблюдается. Полученные данные свидетельствуют о различиях в управлении тканеспецифической миграцией Т-хелперов при данных заболеваниях.

Список литературы/References

1. Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Бутина Т.Ю., Кузнецова И.В., Шутова И.В., Ларионова Т.В., Ефимова Е.И. Опыт использования метода полимеразной цепной реакции для исследования маркеров *Helicobacter pylori* // Медицинский альманах. 2016. Т. 42, № 2. С. 52–56. [Perfilova K.M., Neumoina N.V., Butina T.Yu., Kuznetsova I.V., Shutova I.V., Larionova T.V., Efimova E.I. Experience of application of polymerase chain reaction method for study of *Helicobacter pylori* markers. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2016, vol. 42, no. 2, pp. 52–56. (In Russ.)]
2. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Бабайкина О.Н., Воронина Е.В. Характеристика малой субпопуляции наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов, несущих хемокиновый рецептор CXCR5 // Иммунология. 2015. Т. 36, № 1. С. 9–13. [Talayev V.Yu., Plehanova M.V., Babaykina O.N., Voronina E.V. Characterization of a small subpopulation of naïve CD4 T-lymphocytes bearing chemokine receptor CXCR5. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 36, no. 1, pp. 9–13. (In Russ.)]
3. Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Талаева Е.Б., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Содержание и фенотип CCR6⁺ и CCR9⁺ Т-хелперов периферической крови у подростков с болезнью Крона // Иммунология. 2017. Т. 38, № 6. С. 313–320. [Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Voronina E.V., Talayeva E.B., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N. Content and phenotype of blood CCR6⁺ and CCR9⁺ T-helper cells in adolescents with Crohn's disease. *Immunologiya = Immunology*, 2017, vol. 38, no. 6, pp. 313–320. (In Russ.)]
4. Bimczok D., Kao J.Y., Zhang M., Cochran S., Mannon P., Peter S., Wilcox C.M., Mönkemüller K.E., Harris P.R., Grams J.M., Stahl R.D., Smith P.D., Smythies L.E. Human gastric epithelial cells contribute to gastric immune regulation by providing retinoic acid to dendritic cells. *Mucosal Immunol.*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 533–544. doi: 10.1038/mi.2014.86
5. Carbo A., Olivares-Villagomez D., Hontecillas R., Bassaganya-Riera J., Chaturvedi R., Piazuelo M.B., Delgado A., Washington M.K., Wilson K.T., Algood H.M. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4⁺ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio*, 2014, vol. 5: e01243-14. doi: 10.1128/mBio.01243-14
6. Caruso R., Fina D., Paoluzi O.A., Del Vecchio Blanco G., Stolfi C., Rizzo A., Caprioli F., Sarra M., Andrei F., Fantini M.C., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G. IL-23-mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Eur. J. Immunol.*, 2008, vol. 38, pp. 470–478. doi: 10.1002/eji.200737635
7. Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1999, vol. 13, pp. 851–856. doi: 10.1038/sj.bjc.6690444
8. Eaton K.A., Ringler S.R., Danon S.J. Murine splenocytes induce severe gastritis and delayed-type hypersensitivity and suppress bacterial colonization in *Helicobacter pylori*-infected SCID mice. *Infect. Immun.*, 1999, vol. 67, no. 9, pp. 4594–4602.
9. Evans-Marin H.L., Cao A.T., Yao S., Chen F., He C., Liu H., Wu W., Gonzalez M.G., Dann S.M., Cong Y. Unexpected regulatory role of CCR9 in regulatory T cell development. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0134100. doi: 10.1371/journal.pone.0134100
10. Graham D.Y., Opekun A.R., Osato M.S., El-Zimaity H.M., Lee C.K., Yamaoka Y., Qureshi W.A., Cadzow M., Monath T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, 2004, vol. 53, pp. 1235–1243. doi: 10.1136/gut.2003.037499
11. Gray B.M., Fontaine C.A., Poe S.A., Eaton K.A. Complex T cell interactions contribute to *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, pp. 740–752. doi: 10.1128/IAI.01269-12
12. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 1999, vol. 397, no. 6716, pp. 263–266. doi: 10.1038/16717
13. Khamri W., Walker M.M., Clark P., Atherton J.C., Thursz M.R., Bamford K.B., Lechler R.I., Lombardi G. *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4⁺ T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, pp. 845–853. doi: 10.1128/IAI.00524-09
14. Kiriya K., Watanabe N., Nishio A., Okazaki K., Kido M., Saga K., Tanaka J., Akamatsu T., Ohashi S., Asada M., Fukui T., Chiba T. Essential role of Peyer's patches in the development of *Helicobacter*-induced gastritis. *Int. Immunol.*, 2007, vol. 19, no. 4, pp. 435–446. doi: 10.1093/intimm/dxm008
15. Kronsteiner B., Bassaganya-Riera J., Philipson C., Viladomiu M., Carbo A., Abedi V., Hontecillas R. Systems-wide analyses of mucosal immune responses to *Helicobacter pylori* at the interface between pathogenicity and symbiosis. *Gut Microbes.*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 3–21. doi: 10.1080/19490976.2015.1116673
16. Kunkel E.J., Campbell J.J., Haraldsen G., Pan J., Boisvert J., Roberts A.I., Ebert E.C., Vierra M.A., Goodman S.B., Genovese M.C., Wardlaw A.J., Greenberg H.B., Parker C.M., Butcher E.C., Andrew D.P., Agace W.W. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, no. 5, pp. 761–768. doi: 10.1084/jem.192.5.761

17. Leber A., Abedi V., Hontecillas R., Viladomiu M., Hoops S., Ciupe S., Caughman J., Andrew T., Bassaganya-Riera J. Bistability analysis of CD4+ T follicular helper and regulatory cells during *Helicobacter pylori* infection. *J. Theor. Biol.*, 2016, vol. 398, pp. 74–84. doi: 10.1016/j.jtbi.2016.02.036
18. Lina T.T., Alzahani S., Gonzalez J., Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 36, pp. 12753–12766. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12753
19. Ma C.S., Deenick E.K., Batten M., Tangye S.G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.*, 2012, vol. 209, no. 7, pp. 1241–1253. doi: 10.1084/jem.20120994
20. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984, vol. 1, no. 8390, pp. 1311–1315. doi: 10.1016/S0140–6736(84)91816–6
21. Matsumoto M., Yokoyama H., Suzuki H., Shiraishi-Yokoyama H., Hibi T. Retinoic acid formation from retinol in the human gastric mucosa: role of class IV alcohol dehydrogenase and its relevance to morphological changes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005, vol. 289, no. 3, pp. G429–433. doi: 10.1152/ajpgi.00502.2004
22. Mora J.R., Iwata M., von Andrian U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, no. 9, pp. 685–698. doi: 10.1038/nri2378
23. Moyat M., Velin D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 19, pp. 5583–5593. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5583
24. Nurgalieva Z.Z., Conner M.E., Opekun A.R., Zheng C.Q., Elliott S.N., Ernst P.B., Osato M., Estes M.K., Graham D.Y. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, pp. 2999–3006. doi: 10.1128/IAI.73.5.2999–3006.2005
25. Papadakis K.A., Landers C., Prehn J., Kouroumalis E.A., Moreno S.T., Gutierrez-Ramos J.C., Hodge M.R., Targan S.R. CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 1, pp. 159–165. doi: 10.4049/jimmunol.171.1.159
26. Shi Y., Liu X.F., Zhuang Y., Zhang J.Y., Liu T., Yin Z., Wu C., Mao X.H., Jia K.R., Wang F.J., Guo H., Flavell R.A., Zhao Z., Liu K.Y., Xiao B., Guo Y., Zhang W.J., Zhou W.Y., Guo G., Zou Q.M. *Helicobacter pylori* induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, pp. 5121–5129. doi: 10.4049/jimmunol.0901115
27. Singh S.P., Zhang H.H., Tsang H., Gardina P.J., Myers T.G., Nagarajan V., Lee C.H., Farber J.M. PLZF regulates CCR6 and is critical for the acquisition and maintenance of the Th17 phenotype in human cells. *J. Immunol.*, 2015, vol. 194, no. 9, pp. 4350–4361. doi: 10.4049/jimmunol.1401093
28. Suzuki T., Kato K., Ohara S., Noguchi K., Sekine H., Nagura H., Shimosegawa T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Pathol. Int.*, 2002, vol. 52, pp. 265–271.
29. Villablanca E.J., Cassani B., von Andrian U.H., Mora J.R. Blocking lymphocyte localization to the gastrointestinal mucosa as a therapeutic strategy for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2011, vol. 140, no. 6, pp. 1776–1784. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.015
30. Wang C., Kang S.G., Lee J., Sun Z., Kim C.H. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol.*, 2009, vol. 2, pp. 173–183. doi: 10.1038/mi.2008.84

Авторы:

Талаев В.Ю., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Талаева М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Воронина Е.В., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Заиченко И.Е., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Неумоина Н.В., к.м.н., главный врач Клиники инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Перфилова К.М., к.м.н., зам. главного врача Клиники инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Бабайкина О.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Talayev V.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Talaeva M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Voronina E.V., Junior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Zaichenko I.Ye., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Neumoina N.V., PhD (Medicine), Head Physician, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Perfilova K.M., PhD (Medicine), Deputy Head Physician, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Babaykina O.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.06.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 26.03.2019

Received 18.06.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 26.03.2019

НАРУШЕНИЯ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ Т-ХЕЛПЕРОВ 17 И ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

И.В. Кудрявцев^{1,2,3}, М.К. Серебрякова², А.А. Старшинова¹, Ю.С. Зинченко^{1,4}, Н.Ю. Басанцова^{1,4}, Е.Н. Беляева^{4,5}, М.В. Павлова⁴, П.К. Яблонский^{1,4}

¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербурга, Россия

³ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербурга, Россия

⁴ ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ СПбГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Туберкулез (ТБ) является одним из самых распространенным среди всех современных инфекционных заболеваний в мире. *Mycobacterium tuberculosis* — внутриклеточный патоген, для эффективной элиминации которого необходима активация Т-хелперов 1 типа (Th1), синтезирующих IFN γ для активации функциональной активности тканевых макрофагов. Помимо Th1, в элиминации бактериальных патогенов могут принимать участие различные субпопуляции Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Tfh), способных к продукции широкого спектра цитокинов, включая IFN γ . Поэтому целью данного исследования являлся анализ субпопуляционного состава Th клеток при ТБ. При помощи многоцветной проточной цитометрии у больных ТБ (n = 40) и условно здоровых добровольцев (n = 30) были выявлены основные субпопуляции CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. Было показано, что при ТБ в циркуляции снижался уровень CD45RA⁻CCR7⁺ Th центральной памяти (СМ). В пределах СМ у больных ТБ достоверно (p = 0,012) возрастало относительное содержание Th2 клеток с 7,21% (5,64; 9,84) до 9,11% (6,95; 13,77), а уровень Th17 достоверно (p = 0,016) снижался с 40,39% (35,41; 47,79) до 35,92% (27,72; 41,06), тогда как Th1 и Tfh достоверно не изменялись. Среди CCR6⁺ СМ Th при ТБ выявлено снижение CCR4⁻CXCR3⁺ Th17.1 клеток с 52,26% (46,45; 56,95) до 42,87% (33,64; 49,45) при p < 0,001, тогда как уровни «классических» CCR4⁺CXCR3⁻ Th17 и CCR6⁺DP Th17 в периферической крови больных достоверно возрастали (p = 0,005 и p = 0,002). Более того, при инфицировании *M. tuberculosis* наблюдалось изменение субпопуляционного состава Tfh, связанное с увеличением (p = 0,021) уровня в циркуляции Tfh2 с фенотипом CXCR3⁻CCR6⁻ на фоне снижения относительного содержания Tfh1 клеток (p = 0,036). При изучении субпопуляционного состава CCR6⁺ Th17 эффекторной памяти (CD45RA⁻CCR7⁻) в периферической крови больных ТБ было обнаружено достоверное (p = 0,006) снижение Th17.1 лимфоцитов с 61,76% (54,01; 65,63) до 54,43% (41,19; 91,92), тогда как уровень «дважды позитивных» Th17 при инфицировании *M. tuberculosis* достоверно возрастал по сравнению с группой контроля (20,83% (15,12; 30,87) и 12,93% (9,80; 19,01) соответственно, при

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (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:

Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Старшинова А.А., Зинченко Ю.С., Басанцова Н.Ю., Беляева Е.Н., Павлова М.В., Яблонский П.К. Нарушения в субпопуляционном составе Т-хелперов 17 и фолликулярных Т-хелперов у больных туберкулезом легких // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 304–314. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-304-314

Citation:

Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Starshinova A.A., Zinchenko Yu.S., Basantsova N.Yu., Belyaeva E.N., Pavlova M.V., Yablonskiy P.K. Altered peripheral blood Th17 and follicular T-helper subsets in patients with pulmonary tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 304–314. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-304-314

Работа поддержана грантом Правительства РФ (договор № 14.W03.31.0009 от 13.02. 2017 г.) о выделении гранта для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых

$p < 0,001$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что при инфекционном процессе, вызванном *M. tuberculosis*, относительное содержание IFN γ -продуцирующих клеток среди Th17 и Tfh снижается по сравнению с контролем. Причем, эти изменения затрагивают как клетки центральной памяти, «патрулирующие» периферические органы иммунной системы, так и клетки эффекторной памяти, способные покидать кровоток и мигрировать в очаг проникновения патогена.

Ключевые слова: туберкулез, хемокиновые рецепторы, CD3⁺CD4⁺ центральной памяти, T-хелперы 17, Th17.1, фолликулярные T-хелперы.

ALTERED PERIPHERAL BLOOD Th17 AND FOLLICULAR T-HELPER SUBSETS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Kudryavtsev I.V.^{a,b,c}, Serebryakova M.K.^b, Starshinova A.A.^a, Zinchenko Yu.S.^{a,d}, Basantsova N.Yu.^{a,d}, Belyaeva E.N.^{d,e}, Pavlova M.V.^d, Yablonskiy P.K.^{a,d}

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

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

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

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

^e City Multi-Profile Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Tuberculosis (TB) is one of the most common infections worldwide. Eradication of an intracellular pathogen *M. tuberculosis* requires to induce a Th1 response by activating IFN γ -producing tissue macrophages. Along with Th1 cells, various subsets of Th17 and follicular T-helper cells (Tfh) able to secrete a broad range of cytokines, including IFN γ , can also be involved in eliminating bacterial pathogens. It justified analyzing in this study changes in percentage of various peripheral blood Th subsets, including Th1, Th2, Th17 and Tfh cells, in TB patients. For this, major CD3⁺CD4⁺ T cell subsets were assessed by using multicolor flow cytometry in TB patients (n = 40) and healthy volunteers (n = 30). It was found that in TB patients vs. control group percentage of peripheral blood CD45RA⁻CCR7⁺ central memory (CM) Th was decreased also affecting frequency of some functional T cell subsets, e.g. either lowering Th2 cells (9.11% (6.95; 13.77) vs. 7.21% (5.64; 9.84), $p = 0.012$) or elevating CCR6⁺ Th17 subsets (35.92% (27.72; 41.06) vs. 40.39% (35.41; 47.79; $p = 0.016$), respectively, but not influencing Th1 and Tfh subsets frequencies. Moreover, percentage of total CCR6⁺ CM Th cells in TB patients vs. control was decreased in CCR4⁻CXCR3⁺ Th17.1 cell subset (42.87% (33.64; 49.45) vs. 52.26% (46.45; 56.95), $p < 0.001$), whereas standard CCR4⁺CXCR3⁻ Th17 and CCR6⁺ DP Th17 subsets were elevated ($p = 0.005$ and $p = 0.002$, respectively). In addition, altered Tfh subset composition associated with the increased ($p = 0.021$) percentage of CXCR3⁻CCR6⁻ Tfh2 cells, but decreased CXCR3⁺CCR6⁻ Tfh1 cells ($p = 0.036$) was observed. Finally, frequency of peripheral blood Th subsets noted above was also analyzed within effector memory (CD45RA⁻CCR7⁻) cells. It was found that in TB patients vs. volunteers frequency of Th17.1 cells was also significantly lower ($p = 0.006$) in CCR6⁺ EM Th (54.43% (41.19; 91.92) vs. 61.76% (54.01; 65.63), whereas percentage of double-positive Th17 was significantly increased (20.83% (15.12; 30.87) and 12.93 % (9.80; 19.01), respectively, $p < 0.001$). Thus, it suggests that during *M. tuberculosis* infection percentage of IFN γ -producing Th17 and Tfh cells was reduced compared to control group also affecting both central memory Th cells patrolling peripheral lymphoid organs as well as effector memory Th cells able to exit to site of infection.

Key words: tuberculosis, chemokine receptors expression, central memory CD3⁺CD4⁺ T cells, Th17, Th17.1, follicular Th cells.

Туберкулез по-прежнему остается смертельно опасной инфекцией, унесшей 1 млн 300 тыс. жизней в 2017 г. [10]. Известно, что, несмотря на значительную долю инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* людей, составляющую примерно одну треть населения земного шара, только в 5–10% случаев происходит развитие туберкулеза в той или иной клинической форме. У остальных инфекция носит латентный, бессимптомный характер. Взаимодействие *M. tuberculosis* с организмом хозяина, в результате которого происходит активация инфекции или, напротив, ее локализация, остается недостаточно понятным [10, 32]. Совместное действие механизмов врожденного и приобретенного иммунитета в большинстве случаев приводит либо к полному освобождению от инфекции, либо к подавлению ее активности с переходом инфекционного

процесса в латентную форму. В отдельных случаях возможны нарушения в этой цепи взаимодействий, следствием чего является развитие инфекции не только в легких, но и диссеминация *M. tuberculosis* с кровью в различные ткани организма. Очевидно, что предрасположенность к развитию клинических форм туберкулеза носит гетерогенный, многофакторный характер.

Считается, что циркулирующие в периферической крови и инфильтрирующие периферические ткани Т-хелперы (Th), обладающие фенотипом CD3⁺CD4⁺, играют ведущую роль в развитии эффективного ответа на патогены различной локализации. Так, в ответ на *M. tuberculosis* CD4⁺ Т-лимфоциты секретируют различные регуляторные молекулы — цитокины и хемокины, которые действуют либо аутокринно, обеспечивая активацию самих Th, либо паракринно, ре-

гулируя функциональную активность широкого спектра клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Следует отметить, что CD3⁺CD4⁺ лимфоциты являются крайне гетерогенной популяцией клеток, среди которых выделяют Th1, Th2, Th17, а также фолликулярные (Tfh) и регуляторные Т-лимфоциты [5]. Более того, в результате исследований, проведенных в последнее десятилетие, общий пул Th17 [31] и Tfh [19] клеток периферической крови был разделен на несколько отдельных субпопуляций, которые различались по своим функциональным и фенотипическим особенностям.

Считается, что Th1 при туберкулезе играют ведущую роль в активации антимикробной защиты за счет продукции IFN γ и TNF α , что приводит к активации микробицидных свойства макрофагов соединительной ткани [4, 25], тогда как Т-хелперы 17 (Th17), способные к секреции цитокинов семейства IL-17, активируют нейтрофилы периферической крови, привлекают их в очаг проникновения патогена и, помимо защитных эффектов, вызывают повреждение окружающих тканей [17]. Вместе с тем данные литературы указывают на то, что подавляющее большинство Т-лимфоцитов, способных к распознаванию антигенов *M. tuberculosis* обладают фенотипом CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁻ [7], что позволяет рассматривать их в качестве Th17.1 клеток, обладающих целым спектром свойств как Th1, так и Th17.

Таким образом, клетки данного фенотипа при активации способны секретировать широкий спектр цитокинов, которые, помимо активации макрофагов, способны вызывать нейтрофильное воспаление, что в случае ТБ рассматривается в качестве фактора, вызывающего массивное повреждение тканей [13]. Поэтому целью исследования явилось выявление изменений в субпопуляционном составе циркулирующих Th17 и Tfh клеток у больных туберкулезом легких.

Материалы и методы

Проспективное сравнительное исследование было проведено за период с 2015 по 2017 гг. с подбором пациентов на базе ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ и СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2. Исследование было одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России (выписка из протокола № 34.2 от 19.01.2017) и Локальным Этическим Комитетом Санкт-Петербургского Государственного Университета (протокол № 01-126 30.06.17). Все участники исследования подписали информированное согласие на обработку индивидуальных данных. В данное исследование были включены 40 больных туберкулезом легких с бактериовыделением. В группу конт-

роля вошли образцы периферической крови 30 условно здоровых добровольцев аналогичного возрастного и полового состава, не имеющих факторов риска развития туберкулеза.

Имунофенотипирование основных субпопуляций Т-хелперов периферической крови проводилось в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Хайдуковым С.В. и соавт. [6]. Подбор оптимальных пар антитело–флуорохром осуществляли в соответствии с описанными в литературе принципами [3]. Для выявления основных субпопуляций Т-хелперов 200 мкл цельной ЭДТА-стабилизированной периферической крови окрашивали на поверхностные антигены при помощи следующей комбинации моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами: anti-CD183 (CXCR3) Alexa Fluor 488 (клон G025H7, изотип — Mouse IgG1, κ), anti-CD25 PE (клон B1.49.9, изотип — IgG2a Mouse), anti-CD185 (CXCR5) PE/Dazzle™ 594 (клон J252D4, изотип — Mouse IgG1, κ), anti-CD194 (CCR4) PerCP/Cy5.5 (клон L291H4, изотип — Mouse IgG1, κ), anti-CD196 (CCR6) PE/Cy7 (клон G034E3, изотип — Mouse IgG2b, κ), anti-CD4 APC (клон 13B8.2, изотип — IgG1 Mouse), anti-CD8 APC-AF700 (клон B9.11, изотип — IgG1 Mouse), anti-CD3 APC/Cy7 (клон HIT3a, изотип — Mouse IgG2a, κ), anti-CD197 (CCR7) Brilliant Violet 421 (клон G043H7, изотип — Mouse IgG2a, κ) и anti-CD45RA Brilliant Violet 510 (клон HI100, изотип — Mouse IgG2b, κ). Антитела против CD25, CD4 и CD8 производства Beckman Coulter Inc. (США), остальные — BioLegend Inc. (США). После инкубации с антителами при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин проводился лизис эритроцитов при помощи 2 мл VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, Inc., США) с добавлением 50 мкл IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, Inc., США) в течение 15 мин. После этого образцы дважды отмывали избытком забуференного фосфатами физиологического раствора (ЗФР) (центрифугирование 7 мин при 330g), содержащего 2% термоинактивированной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma-Aldrich, США), полученный клеточных осадок ресуспендировали в 0,5 мл свежего ЗФР, содержащего 2% формалина (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводился при помощи проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, Inc., США), оснащенного тремя лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 638 нм. Для каждого из образцов анализировалось не менее 40 000 CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. Тактика «гейтирования» для выделения субпопуляций Т-клеток была описана ранее [2]. Полученные данные анализировались при помощи программного обеспечения Kaluza software (Beckman Coulter, Inc., США).

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Полученные результаты выражали в виде процента клеток от искомой популяции и приводили как медиану и интерквартильный размах (Med (Q25; Q75)). Нормальность распределения оценивали при помощи теста Шапиро–Вилка (во всех группах было менее 50 пациентов). Статистическое сравнение данных между группой больных туберкулезом и условно здоровых добровольцев проводилось с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

Относительное содержание $CD3^+CD4^+$ клеток в рамках общей популяции Т-лимфоцитов периферической крови достоверно не различалось ($p = 0,275$) между группами и составля-

ло 63,03% (58,65; 68,80) у больных ТБ и 64,32% (61,19; 71,29) в группе сравнения. При анализе основных стадий созревания Th клеток применяли антитела против поверхностных $CD45RA$ и $CCR7$, что позволяло выявить «наивные» клетки с фенотипом $CD45RA^+CCR7^+$, Th клетки центральной и эффекторной памяти (СМ и ЕМ с фенотипами $CD45RA^-CCR7^+$ и $CD45RA^-CCR7^-$ соответственно), а также «терминально-дифференцированные» $CD45RA$ -позитивные Th клетки эффекторной памяти (TEMRA, фенотип $CD45RA^+CCR7^-$). В периферической крови как больных ТБ, так и условно здоровых добровольцев доминировали «наивные» Th, уровень которых находился в пределах 50% и достоверно не различался между группами (рис. 1). Вместе с тем было показано, что у больных ТБ достоверно снижалось процентное содержание СМ Th клеток по сравнению с группой контроля (25,15% (19,63; 36,20) и 34,27% (30,40; 48,93) соответственно, при $p = 0,002$). Кроме того, отмечено увеличе-

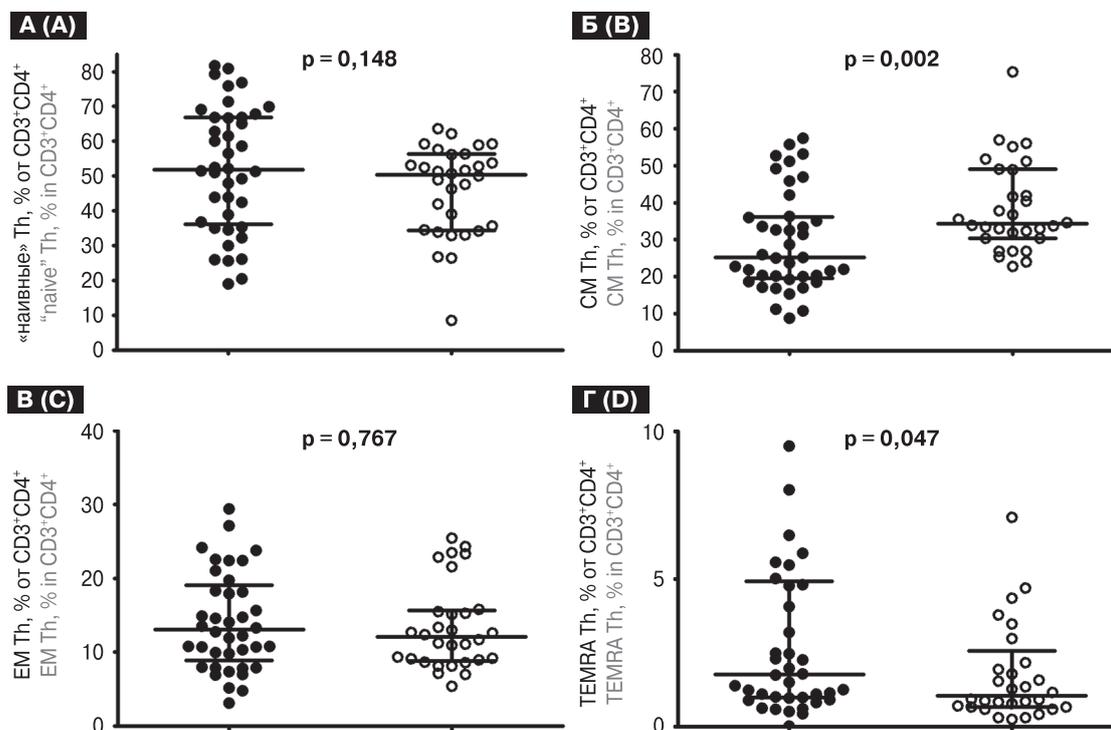


Рисунок 1. Распределение Т-хелперов периферической крови больных ТБ по основным популяциям, выявленным на основании анализа коэкспрессии $CD45RA$ и $CD62L$

Figure 1. Frequency of major peripheral blood $CD45RA$ and $CD62L$ co-expressing Th subsets in TB patients

Примечания. Гистограммы А–Г — относительное содержание «наивных» Th, Th центральной и эффекторной памяти, а также Th лимфоцитов популяции TEMRA соответственно.

Здесь и далее на рисунках 2–5: черным — больные ТБ ($n = 40$); белым — условно здоровые добровольцы ($n = 30$).

Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q25; Q75)]. Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Манна–Уитни.

Notes. A, B, C and D: scatter plots showing percentage of peripheral blood “naive” cells ($CD45RA^+CCR7^+$), central ($CD45RA^-CCR7^+$) and effector ($CD45RA^-CCR7^-$) as well as TEMRA ($CD45RA^+CCR7^-$) Th cells, respectively, in TB patients and healthy control subjects. Percentage of indicated Th subsets out of total $CD3^+CD4^+$ T cells is shown.

Hereinafter, the following groups in Figure 1–5 are denoted by symbols: black circles — TB patients ($n = 40$); white circles — healthy subjects ($n = 30$). Each dot represents an individual subject, horizontal bars represent group medians and quartile ranges [Med (Q25; Q75)]. Statistical analysis was performed by using Mann–Whitney U test.

ние уровня TEMRA Th в периферической крови больных (рис. 1).

В ходе дальнейших исследований был проведен анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 на поверхности Th клеток центральной и эффекторной памяти, что позволяло выявить основные субпопуляции «поляризованных» Т-хелперов. На первом этапе исследований особое внимание было уделено CM Th, так как данный пул клеток был способен к рециркуляции в пределах лимфоидной ткани, что позволяло охарактеризовать процессы дифференцировки и «поляризации» CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов, протекавшие в периферических лимфоидных органах. В рамках общей популяции CM Th были выявлены следующие субпопуляции клеток: Th1 с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻, Th2 с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺, общая популяция Th17 (CXCR5⁻CCR6⁺), а также общая популяция фолликулярных клеток (Tfh) с фенотипом CXCR5⁺CD4⁺CD3⁺. На рисунке 2 показано, что достоверных различий между группами не было отмечено в случае Th1 и Tfh клеток центральной памяти ($p = 0,176$ и $p = 0,427$ соответ-

ственно). Вместе с тем у больных ТБ в периферической крови достоверно ($p = 0,012$) возрастало относительное содержание Th2 клеток с 7,21% (5,64; 9,84) до 9,11% (6,95; 13,77), тогда как уровень Th17 достоверно ($p = 0,016$) снижался с 40,39% (35,41; 47,79) до 35,92% (27,72; 41,06).

В настоящее время среди CCR6⁺ Th17 лимфоцитов можно выделить четыре независимые субпопуляции клеток, которые различаются по уровням экспрессии хемокиновых рецепторов CCR4 и CXCR3 и обладают различными функциональными свойствами [21, 31]. Так, выделяют «классические» CCR4⁺CXCR3⁻ Th17, «дважды позитивные» CCR4⁺CXCR3⁺ или CCR6⁺DP Th17, «неклассические» CCR4⁻CXCR3⁺ или Th17.1, а также «дважды негативные» CCR4⁻CXCR3⁻ или CCR6⁺DN Th17 лимфоциты.

На рисунке 3 приведены результаты сравнения относительного содержания указанных выше популяций Th17 у больных ТБ и условно здоровых добровольцев. Так, при ТБ наблюдается снижение в циркуляции Th17.1 клеток с 52,26% (46,45; 56,95) до 42,87% (33,64; 49,45) при $p < 0,001$, тогда как уровни «классических» и CCR6⁺DP Th17 в периферической крови больных достовер-

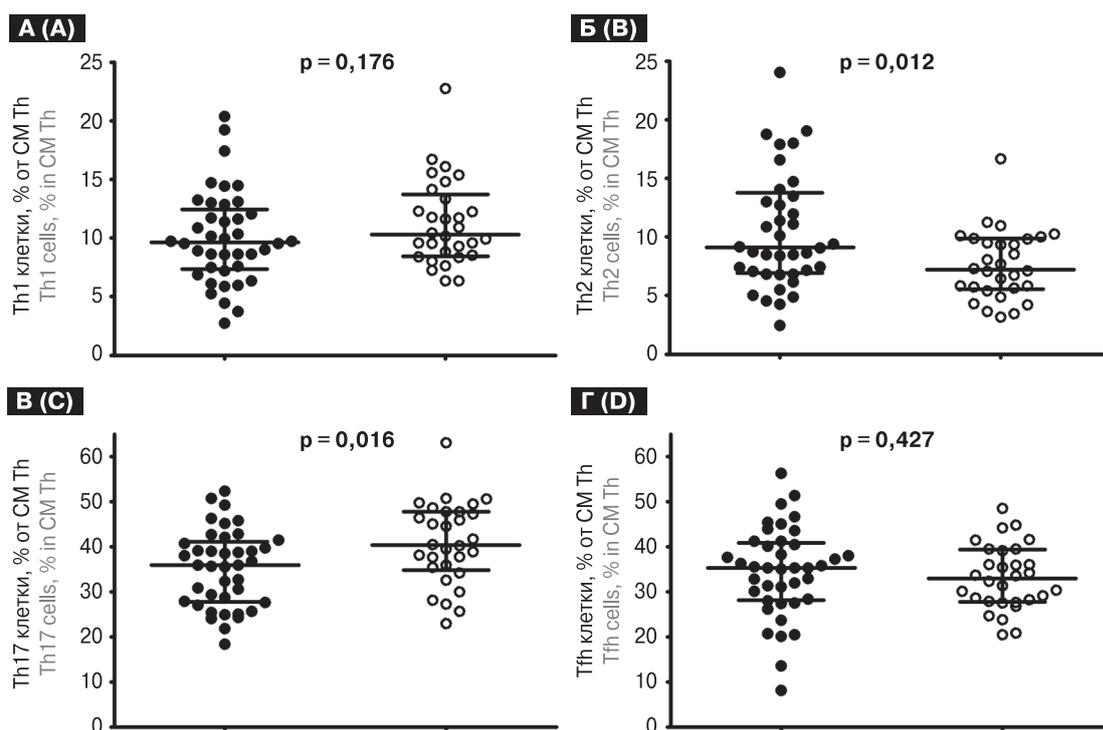


Рисунок 2. Относительное содержание основных субпопуляций Th лимфоцитов среди клеток с фенотипом CD45RA⁻CCR7⁺

Figure 2. Percentage of major “polarized” Th subsets within peripheral blood central memory CD3⁺CD4⁺ T cells samples in TB patients

Примечания. Гистограммы А–Г — относительное содержание Th1 клеток с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻, Th2 с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺, общей популяции Th17 (CXCR5⁻CCR6⁺), а также общей популяции Tfh с фенотипом CXCR5⁺CD4⁺CD3⁺ соответственно.

Notes. A, B, C and D: scatter plots demonstrate the percentage of Th1 (CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻), Th2 (CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺), Th17 (CXCR5⁻CCR6⁺) and Tfh (CXCR5⁺CD4⁺CD3⁺) cells, respectively, within total CD45RA⁻CCR7⁺ CD3⁺CD4⁺ T cell population.

но возрастают по сравнению с группой контроля (14,30% (10,44; 18,73) и 10,75% (7,60; 14,64) при $p = 0,005$ и 28,40% (19,96; 35,69) и 21,01% (18,05; 25,94) при $p = 0,002$).

Еще одной важнейшей субпопуляцией Т-хелперов, подавляющее большинство клеток которой находится в пределах $CD4^+$ лимфоцитов центральной памяти, являются фолликулярные Т-хелперы (Tfh). Следует отметить, что в настоящее время единая панель для анализа субпопуляционного состава Tfh отсутствует. В литературе можно найти описания нескольких подходов для выявления различных типов Tfh, которые могут быть основаны, во-первых, на оценке уровня экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6, во-вторых, на анализе наличия PD-1 (CD279) и CCR7 (CD197), или, в-третьих, PD-1 (CD279) и ICOS (CD278) [30]. В ходе собственных экспериментов нами был использован первый из упомянутых выше подходов, позволяющий оценить уровни CXCR3⁺CCR6⁻ Tfh1-, CXCR3⁻CCR6⁻ Tfh2-, CXCR3⁻CCR6⁺ Tfh17-подобных клеток [19], а также пока еще детально не охарактеризованных так называемых «дважды позитивных» Tfh. Результаты данного исследования приведены на рисунке 4. Так, при

инфицировании *M. tuberculosis* наблюдалось изменение субпопуляционного состава Tfh, связанное с увеличением ($p = 0,021$) уровня в циркуляции Tfh2 с фенотипом CXCR3⁻CCR6⁻ с 16,48% (16,06; 26,07) до 20,31% (16,06; 26,07) на фоне снижения относительного содержания Tfh1 клеток (с 30,27% (24,34; 36,59) до 26,52% (21,43; 30,32) при $p = 0,036$). Достоверных изменений в процентном содержании оставшихся двух типов Tfh — Tfh17 и «дважды позитивных» Tfh — отмечено не было.

Следующий этап исследования был связан с анализом основных субпопуляций «поляризованных» $CD4^+$ лимфоцитов в пределах EM клеток, способных покидать кровотоки и мигрировать в воспаленные периферические ткани. Так, нами не было отмечено достоверных различий между больными ТБ и группой сравнения по уровням Th1 (29,00% (20,77; 37,55) и 24,22% (18,91; 41,67) соответственно, при $p = 0,553$), Th2 (3,63% (2,75; 5,39) и 3,16% (2,31; 3,97) соответственно, при $p = 0,109$), общей популяции CCR6⁺ Th17, относительное содержание которых в обеих группах составляло около 50% от общего числа CM Т-хелперов (49,02% (33,73; 56,17) и 54,84% (37,19; 61,99) соответственно, при $p = 0,173$), а так-

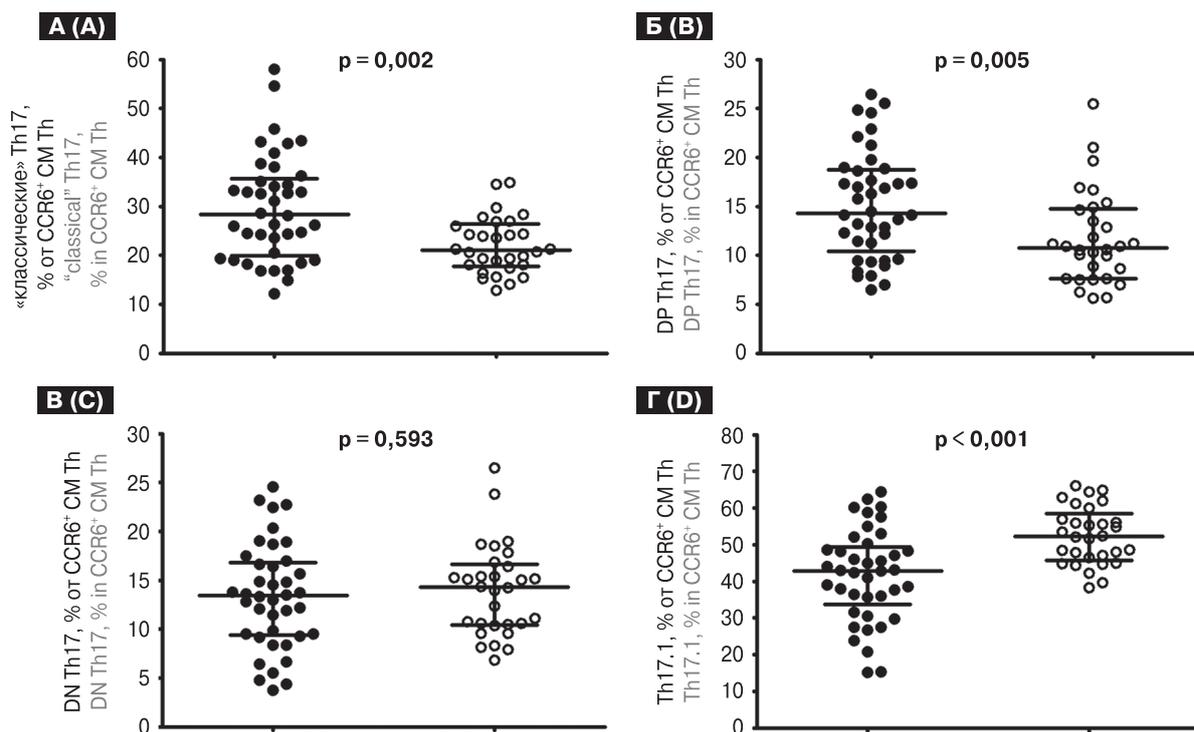


Рисунок 3. Относительное содержание различных субпопуляций Th17 в периферической крови больных ТБ среди CCR6⁺ Т-хелперов центральной памяти

Figure 3. Percentage of various peripheral blood Th17 cell subsets within CCR6⁺CD45RA⁻CCR7⁺ Th cell population in TB patients

Примечания. Гистограммы А–Г — относительное содержание «классических», DP Th17, DN Th17 и Th17.1 соответственно, в рамках общей популяции CCR6⁺ Т-хелперов центральной памяти у больных ТБ (черным) и условно здоровых добровольцев (белым).

Notes. A, B, C and D: scatter plots demonstrate percentage of peripheral blood «classical» Th17, DP Th17, DN Th17 and Th17.1 cells, respectively, out of total CCR6⁺ central memory (CD45RA⁻CCR7⁺) Th cells.

же общей популяции Tfh клеток, составлявших минорную фракцию от всех CD3⁺CD4⁺ клеток эффекторной памяти (3,30% (2,41; 4,35) и 2,71% (1,56; 3,79) соответственно, при $p = 0,296$).

При изучении субпопуляционного состава Th17 эффекторной памяти (рис. 5) в периферической крови больных ТБ было обнаружено достоверное ($p = 0,006$) снижение Th17.1 лимфоцитов с 61,76% (54,01; 65,63) до 54,43% (41,19; 91,92), тогда как уровень «дважды позитивных» Th17 при инфицировании *M. tuberculosis* достоверно возрастал по сравнению с группой контроля (20,83% (15,12; 30,87) и 12,93% (9,80; 19,01) соответственно, при $p < 0,001$). Следует также отметить, что изменение характера распределения Th17 по отдельным субпопуляциям в пределах СМ и ЕМ Т-хелперов примерно совпадало, хотя в последнем случае нам не удалось увидеть достоверных различий по «классическим» Th17. Что же касается Tfh клеток, обнаруженных в составе CD4⁺ лимфоцитов эффекторной памяти, то в пределах данной популяции наблюдались еще более выраженные (по сравнению с СМ Th) изменения. Так, относительное содержание Tfh1 у больных ТБ достоверно ($p = 0,002$) снижалось

с 68,12% (51,74; 73,41) до 50,93% (41,56; 59,96) от общего числа CXCR5⁺ лимфоцитов. При этом, доля Tfh2 возрастала ($p = 0,004$) с 14,35% (10,58; 22,26) до 22,09% (16,40; 30,04) в пределах общего пула CXCR5⁺ ЕМ Tfh.

Обсуждение

Среди клеток приобретенного иммунитета Т-хелперы играют ведущую роль в элиминации бактериальных патогенов, имеющих как внеклеточную, так и внутриклеточную локализацию. Вместе с тем при инфекционных процессах, вызванных *M. tuberculosis*, относительное и абсолютное содержание этих клеток в периферической крови больных существенно не изменяется, что подтверждается как результатами собственного исследования, так и данными литературы [27]. Кроме того, соотношение ключевых субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4/CD8) также достоверно не изменяется при сравнении больных ТБ и условно здоровых добровольцев [1]. С использованием тактики «гейтирования», основанной на оценке уровней экспрессии костимуляционных молекул CD27 и CD28 Th клетками, с по-

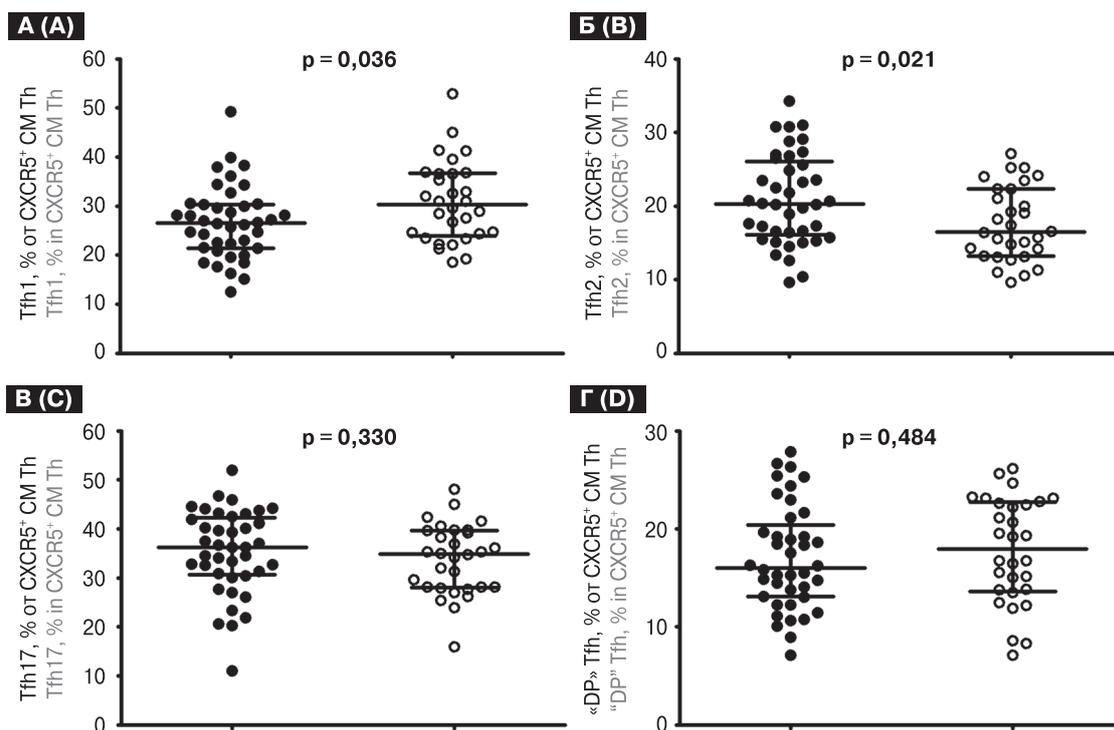


Рисунок 4. Сравнительный анализ субпопуляционного состава циркулирующих Tfh центральной памяти (CXCR5⁺CD45RA⁻CCR7⁺) у пациентов с ТБ

Figure 4. A comparative analysis of peripheral blood memory Tfh cell subsets within CXCR5⁺CD45RA⁻CCR7⁺ Th cell population in TB patients

Примечания. Гистограммы А–Г — относительное содержание CXCR3⁺CCR6⁻ Tfh1⁻, CXCR3⁻CCR6⁻ Tfh2⁻, CXCR3⁻CCR6⁺ Tfh17-подобных клеток, а также «дважды позитивных» Tfh соответственно.

Notes. A, B, C and D: scatter plots demonstrate percentage of peripheral blood CXCR3⁺CCR6⁻ Tfh1⁻, CXCR3⁻CCR6⁻ Tfh2⁻, CXCR3⁻CCR6⁺ Tfh17-like cells as well as CXCR3⁺CCR6⁺ «double-positive» Tfh cells, respectively, in TB patients and healthy control subjects within CXCR5⁺CD45RA⁻CCR7⁺ Th cells.

следующим анализом уровней CD45RA и CD62L на CD27⁺CD28⁺ лимфоцитах, было показано, что в периферической крови больных ТБ увеличился уровень Th клеток «зрелых» фенотипов [1]. В то же время в ходе проведенного исследования с применением антител против CD45RA и CCR7 нами было отмечено снижение уровня CM Th на фоне прироста клеток популяции TEMRA.

При анализе субпопуляционного состава Th периферической крови при ТБ с применением методов неспецифической стимуляции в условиях *in vitro* было показано, что уровень на фоне инфекции в циркуляции снижается уровень CD4⁺IL-17A⁺ клеток, тогда как содержание CD4⁺IL-4⁺ лимфоцитов у больных достоверно возрастало [27]. Использование панели антител против хемокиновых рецепторов в ходе проведенного нами исследования позволило не только подтвердить эти результаты, но и оценить изменения в субпопуляционном составе Th17 без длительной стимуляции *in vitro* и трудоемкой пробоподготовки. Вместе с тем иногда в литературе можно встретить диаметрально противоположные данные о роли Th17 при ТБ. Так, у больных ТБ Wang и соавт. обнаружили повышенное, по сравнению с контролем, содержание IL-17⁺CD4⁺ кле-

ток в циркуляции [32], что подтверждало ранее опубликованные данные о повышенном уровне мРНК IL-17 в лимфоцитах периферической крови больных активной формой ТБ [11]. С другой стороны, двумя независимыми группами исследователей было отмечено снижение уровня Th17 в периферической крови больных [8, 26]. Более того, снижение уровня IL-17 в периферической крови больных ТБ было тесно связано с низкой эффективностью применяемой терапии и неблагоприятным исходом данного заболевания [9]. Особый интерес также представляют литературные данные о том, что более половины IFN γ -секретирующих *M. tuberculosis*-специфических Th клеток обладают фенотипом CXCR3⁺CCR6⁺ [20], что еще раз указывает на важную роль Th17.1 клеток в развитии иммунного ответа при туберкулезе.

Существует гипотеза, что баланс между Th1 и Th17.1 лимфоцитами с более высоким содержанием Th1 клеток по сравнению с Th17.1 может способствовать развитию эффективного иммунного ответа на проникновение *M. tuberculosis* [14]. Более того, было показано, что снижение уровня *M. tuberculosis*-специфических CD4⁺IFN γ ⁺IL-17⁺ тесно связано с увеличением длительности за-

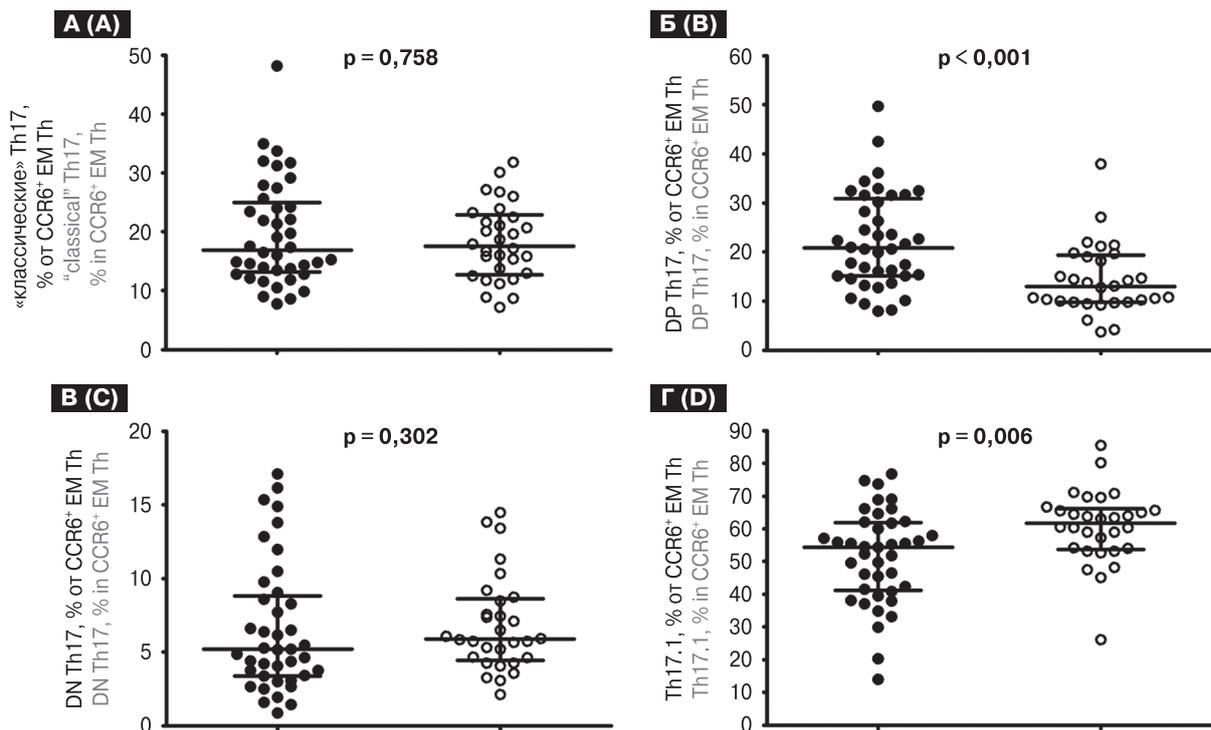


Рисунок 5. Относительное содержание различных субпопуляций Th17 в периферической крови больных ТБ среди CCR6⁺ Т-хелперов эффекторной памяти

Figure 5. Percentage of various peripheral blood Th17 cell subsets out of total CCR6⁺CD45RA⁺CCR7⁻ Th cells in TB patients

Примечания. Гистограммы А–Г — относительное содержание «классических», DP Th17, DN Th17 и Th17.1 соответственно, в рамках общей популяции CCR6⁺ Т-хелперов эффекторной памяти у больных ТБ (черным) и условно здоровых добровольцев (белым).

Notes. A, B, C and D: scatter plots demonstrate percentage of peripheral blood “classical” Th17, DP Th17, DN Th17 and Th17.1 cells, respectively, out of total CCR6⁺ effector memory (CD45RA⁺CCR7⁻) Th cell population.

болевания и снижение уровня продукции $IFN\gamma$ *in vitro*, а высокое содержание этих клеток в крови было характерно для больных с высоким уровнем рентгенологических поражений легких [14]. По-видимому, в случае обследованных нами больных с первично выявленным ТБ снижение относительного содержания $Th17.1$ на фоне достоверно не отличавшегося от контроля содержания $Th1$ клеток может рассматриваться в качестве благоприятного признака успешного развития иммунного ответа. Кроме того, данные литературы свидетельствуют о том, что именно $Th17.1$ являются основными продуцентами $GM-CSF$ [23], уровень которого в периферической крови является одним из перспективных биологических маркеров, позволяющих выявлять ТБ при скрининговых обследованиях [24].

Однако, в пределах обследованной группы больных нами было также отмечено увеличение доли $CCR6^+DP$ $Th17$ лимфоцитов как среди CM , так и среди EM Th клеток. Было показано, что $CCR6^+DP$ $Th17$ в зависимости от цитокинового микроокружения, воссозданного в условиях *in vitro*, обладали способность эффективно дифференцироваться как в сторону « $Th17$ » или « $Th1$ » [31]. Так, инкубация этих клеток в присутствии $IL-1\beta$, $IL-6$ и $IL-23$ (на фоне внесения в культуральную среду антител, блокирующих $IL-4$ и $IFN\gamma$) сопровождалась усилением синтеза и секреции $IL-17A$, $IL-17F$, $IL-22$ и $TNF\alpha$, а также еще и $IFN\gamma$. С другой стороны, наличие в культуральной среде $IL-12$ и анти- $IL-4$ антител приводило к увеличению продукции $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$ [31]. Именно поэтому, в зависимости от цитокинового профиля, механизмы формирования которого в ткани гранулемы до настоящего времени остаются мало исследованными [12], $CCR6^+DP$ $Th17$ будут способны изменять свою функциональную активность.

С применением экспериментальных моделей на лабораторных животных было показано, что $IFN\gamma$ -секретирующие $Th17$ негативно влияют на формирование долговременной иммунной защиты от повторных проникновений *M. tuberculosis*, тогда как накопление $CXCR5^+$ $Th17$ в ткани легкого повышает эффективность защитных реакций по крайней мере у мышей [18]. Иммуногистологический анализ гранулем при экспериментальном заражении лабораторных животных [15], а также образцов, полученных от приматов [22] и инфицированных *M. tuberculosis* пациентов [29], выявил наличие

в их составе оформленных скоплений лимфоцитов, в составе которых обнаруживались не только $CD3^+$, но и $CD19^+$ лимфоциты, формировавшие структуры, напоминавшие зародышевые центры лимфатического узла и содержавшие пролиферирующие В-клетки. Более того, формирование в составе гранулем высокоорганизованных эктопических лимфоидных скоплений, содержащих $CXCR5^+$ Т-клетки, было тесно связано с благоприятным исходом в случае латентного ТБ, тогда как слабо организованные или диффузные лимфоидные образования с низким уровнем Tfh клеток формировались при активной форме ТБ и обладали слабо выраженными защитными свойствами в отношении микобактерий [28]. В рамках последнего из упомянутых исследований также было показано, что $CD4^+CXCR5^+$ лимфоциты обладали способностью к продукции $IFN\gamma$, что позволяло рассматривать их в качестве $Tfh1$.

Нарушения в функциональной активности циркулирующих Tfh клеток отмечались в рамках исследования, проведенного Kumag и соавт. на периферической крови больных с активной формой ТБ [16]. Было показано, что не только уровень $IL-21$ -продуцирующих клеток в крови больных был снижен относительно контрольных значений, но и концентрации данного цитокина в системном кровотоке в случае инфицирования микобактериями были ниже таковых группы сравнения. Более того, уровень $IFN\gamma$, продукция которого традиционно связывается с популяцией $Tfh1$ клеток, также у больных был снижен, что подтверждает наши данные по изменениям в субпопуляционном составе Tfh лимфоцитов у больных ТБ.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что в инфекционном процессе, вызванном *M. tuberculosis*, относительное содержание $IFN\gamma$ -продуцирующих клеток среди $Th17$ и Tfh снижается по сравнению с контролем. Причем эти изменения затрагивают как клетки центральной памяти, «патрулирующие» периферические органы иммунной системы, так и клетки эффекторной памяти, способные покидать кровотоки и мигрировать в очаг проникновения патогена. Все это позволяет поставить вопрос об участии $Th17$ и Tfh в формировании эффективного иммунного ответа против *M. tuberculosis*, а также рассматривать эти популяции клеток в качестве потенциальных мишеней диагностики и при проведении терапии.

Список литературы/References

1. Васильева Е.В., Кудрявцев И.В., Максимов Г.В., Вербов В.Н., Серебрякова М.К., Ткачук А.П., Тотолян А.А. Влияние ВИЧ-инфекции и туберкулеза на степень дифференцировки Т-лимфоцитов периферической крови // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 151–161. [Vasilyeva E.V., Kudryatsev I.V., Maksimov G.V., Verbov V.N., Serebryakova M.K., Tkachuk A.P., Totolian A.A. Impact of HIV infection and tuberculosis on the degree of differentiation peripheral blood T lymphocytes. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 151–161. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-151-161 (In Russ.)]

2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тоголян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 239–250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 239–250. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250 (In Russ.)]
3. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Experience in measuring the parameters of the immune status using six-color cytofluorimetric analysis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]
4. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 6. С. 657–672. [Nikonova A.A., Khaïtov M.R., Khaïtov R.M. Characteristics and role of macrophages in pathogenesis of acute and chronic lung diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 6, pp. 657–672 doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-657-672 (In Russ.)]
5. Соколов Д.И., Степанова О.И., Сельков С.А. Роль различных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов при беременности // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 6. С. 521–536. [Sokolov D.I., Stepanova O.I., Selkov S.I. The role of the different subpopulations of CD4+ T lymphocytes during pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 521–536. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-521-536 (In Russ.)]
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тоголян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
7. Arlehamn C.L., Seumois G., Gerasimova A., Huang C., Fu Z., Yue X., Sette A., Vijayanand P., Peters B. Transcriptional profile of tuberculosis antigen-specific T cells reveals novel multifunctional features. *J. Immunol.*, 2014, vol. 193, no. 6, pp. 2931–2940. doi: 10.4049/jimmunol.1401151
8. Chen X., Zhang M., Liao M., Graner M.W., Wu C., Yang Q., Liu H., Zhou B. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, vol. 181, no. 7, pp. 734–742. doi: 10.1164/rccm.200909-1463OC
9. Chen Y.C., Chin C.H., Liu S.F., Wu C.C., Tsen C.C., Wang Y.H., Chao T.Y., Lie C.H., Chen C.J., Wang C.C., Lin M.C. Prognostic values of serum IP-10 and IL-17 in patients with pulmonary tuberculosis. *Dis. Markers*, 2011, vol. 31, no. 2, pp. 101–110. doi: 10.3233/DMA-2011-0808
10. Churchyard G., Kim P., Shah N.S., Rustomjee R., Gandhi N., Mathema B., Dowdy D., Kasmar A., Cardena V. What we know about tuberculosis transmission: an overview. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216, no. 6, pp. S629–S635. doi: 10.1093/infdis/jix362
11. Dheda K., Chang J.S., Lala S., Huggett J.F., Zumla A., Rook G.A. Gene expression of IL17 and IL23 in the lungs of patients with active tuberculosis. *Thorax*, 2008, vol. 63, no. 6, pp. 566–568. doi: 10.1136/thx.2007.092205
12. Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S.A. Cytokines and chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 5. doi: 10.1128/microbiolspec.TB2-0018-2016
13. Dorhoi A., Reece S.T., Kaufmann S.H. For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 240, no. 1, pp. 235–251. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x
14. Jurado J.O., Pasquinelli V., Alvarez I.B., Peña D., Rovetta A.I., Tateosian N.L., Romeo H.E., Musella R.M., Palmero D., Chuluyán H.E., García V.E. IL-17 and IFN γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, vol. 91, no. 6, pp. 991–1002. doi: 10.1189/jlb.1211619
15. Kahnert A., Höpken U.E., Stein M., Bandermann S., Lipp M., Kaufmann S.H. Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. *J. Infect. Dis.*, 2007, vol. 195, no. 1, pp. 46–54. <https://doi.org/10.1086/508894>
16. Kumar N.P., Sridhar R., Hanna L.E., Banurekha V.V., Nutman T.B., Babu S. Decreased frequencies of circulating CD4+ T follicular helper cells associated with diminished plasma IL-21 in active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 10: e111098. doi: 10.1371/journal.pone.0111098
17. Lyadova I.V., Panteleev A.V. Th1 and Th17 Cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. *Mediators Inflamm.*, 2015, vol. 2015, pp. 854507. doi: 10.1155/2015/854507
18. Monin L., Griffiths K.L., Slight S., Lin Y., Rangel-Moreno J., Khader S.A. Immune requirements for protective Th17 recall responses to Mycobacterium tuberculosis challenge. *Mucosal Immunol.*, 2015, vol. 8, no. 5, pp. 1099–1109.
19. Morita R., Schmitt N., Bentebibel S.E., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G., Foucat E., Dullaers M., Oh S., Sabzghabaei N., Lavecchio E.M., Punaro M., Pascual V., Banchereau J., Ueno H. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*, 2011, vol. 34, no. 1, pp. 108–121. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.012
20. Nikitina I.Y., Panteleev A.V., Kosmiadi G.A., Serdyuk Y.V., Nenasheva T.A., Nikolaev A.A., Gorelova L.A., Radaeva T.V., Kiseleva Y.Y., Bozhenko V.K., Lyadova I.V. Th1, Th17, and Th1Th17 lymphocytes during tuberculosis: Th1 lymphocytes predominate and appear as low-differentiated CXCR3+CCR6+ cells in the blood and highly differentiated CXCR3+/-CCR6- cells in the lungs. *J. Immunol.*, 2018, vol. 200, no. 6, pp. 2090–2103. doi: 10.4049/jimmunol.1701424
21. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, vol. 74, pp. 43–53. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.002
22. Phuah J.Y., Mattila J.T., Lin P.L., Flynn J.L. Activated B cells in the granulomas of nonhuman primates infected with Mycobacterium tuberculosis. *Am. J. Pathol.*, 2012, vol. 181, no. 2, pp. 508–514. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.05.009

23. Ramesh R., Kozhaya L., McKevitt K., Djuretic I.M., Carlson T.J., Quintero M.A., McCauley J.L., Abreu M.T., Unutmaz D., Sundrud M.S. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J. Exp. Med.*, 2014, vol. 211, pp. 89–104. doi: 10.1084/jem.20130301
24. Sariko M., Maro A., Gratz J., Houpt E., Kisona R., Mpagama S., Heysell S., Mmbaga B.T., Thomas T.A. Evaluation of cytokines in peripheral blood mononuclear cell supernatants for the diagnosis of tuberculosis. *J. Inflamm. Res.*, 2018, vol. 12, pp. 15–22. doi: 10.1371/journal.pone.0169118
25. Schaible U.E., Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Russell D.G. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, no. 3, pp. 1290–1296.
26. Scriba T.J., Kalsdorf B., Abrahams D.A., Isaacs F., Hofmeister J., Black G., Hassan H.Y., Wilkinson R.J., Walzl G., Gelderbloem S.J., Mahomed H., Hussey G.D., Hanekom W.A. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 3, pp. 1962–1970.
27. Shu C.C., Wu M.F., Wang J.Y., Lai H.C., Lee L.N., Chiang B.L., Yu C.J. Decreased T helper 17 cells in tuberculosis is associated with increased percentages of programmed death ligand 1, T helper 2 and regulatory T cells. *Respir. Res.*, 2017, vol. 18, no. 1, pp. 128. doi: 10.1186/s12931-017-0580-3
28. Slight S.R., Rangel-Moreno J., Gopal R., Lin Y., Fallert Junecko B.A., Mehra S., Selman M., Becerril-Villanueva E., Baquera-Heredia J., Pavon L., Kaushal D., Reinhart T.A., Randall T.D., Khader S.A. CXCR5+ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *J. Clin. Invest.*, 2013, vol. 123, no. 2, pp. 712–726. doi: 10.1172/JCI65728
29. Tsai M.C., Chakravarty S., Zhu G., Xu J., Tanaka K., Koch C., Tufariello J., Flynn J., Chan J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.*, 2006, vol. 8, no. 2, pp. 218–232. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00612.x
30. Ueno H., Banchereau J., Vinuesa C.G. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.*, 2015, vol. 16, no. 2, pp. 142–152. doi: 10.1038/ni.3054
31. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyns H., Fromentin R., Jenabian M.A., Vartanian S., Deeks S.G., Chomont N., Routy J.P., Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 2016, vol. 13, pp. 59. doi: 10.1186/s12977-016-0293-6
32. Wang T., Lv M., Qian Q., Nie Y., Yu L., Hou Y. Increased frequencies of T helper type 17 cells in tuberculous pleural effusion. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2011, vol. 91, no. 3, pp. 231–237. doi: 10.1016/j.tube.2011.02.002

Авторы:

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

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

Старшинова А.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Зинченко Ю.С., младший научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Басанцова Н.Ю., младший научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета, ассистент кафедры факультетской терапии ФГБУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Беляева Е.Н., к.м.н., младший научный сотрудник ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; зав. отделением СПбГБУ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия;

Павлова М.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель направления «Фтизиопульмонология» ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Яблонский П.К., д.м.н., профессор, декан медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета; директор ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

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

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

Starshinova A.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Autoimmunity Mosaic Laboratory, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Zinchenko Yu.S., Junior Researcher, Autoimmunity Mosaic Laboratory, St. Petersburg State University, St. Petersburg; Junior Researcher, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Basantsova N.Yu., Junior Researcher, Autoimmunity Mosaic Laboratory, Assistant Professor, Department of Faculty Therapy, St. Petersburg State University; Junior Researcher, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Belyaeva E.N., PhD (Medicine), Junior Researcher, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department St. Petersburg City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation;

Pavlova M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Head of Research Direction “Phthisiopulmonology”, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Yablonskii P.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Dean of the Medicine Faculty, St. Petersburg State University; Director of the Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.03.2019
Отправлена на доработку 20.05.2019
Принята к печати 20.05.2019

Received 09.03.2019
Revision received 20.05.2019
Accepted 20.05.2019

АССОЦИАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАРКЕРОВ Th1 И Th2 ИММУНИТЕТА С ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ HLA У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ

О.М. Кудрявцева, С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, Н.И. Микшис,
А.Ю. Гончарова, С.Н. Ключева, С.А. Щербаклова

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

Резюме. На территории Российской Федерации для иммунизации людей по эпидемическим показаниям используется живая аттенуированная вакцина, созданная на основе штамма *Y. pestis* линии НИИЭГ. Препарат характеризуется высокой эффективностью, однако колебания индивидуальных значений адаптивного иммунитета в ответ на вакцинацию диктуют необходимость установления генов, контролирующей вариативность иммунного ответа. Немаловажную роль в этом процессе играет полиморфизм генов HLA (Human Leukocyte Antigen). В ходе нашего исследования определены гаплотипы HLA II класса HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 у 120 людей, проживающих на территории Прикаспийского природного очага чумы, иммунизированных против чумы. Выявлена корреляция групп аллелей HLA-DRB1*01 ($p = 0,03$), HLA-DRB1*03 ($p = 0,01$), HLA-DRB1*07 ($p = 0,01$) и HLA-DRB1*11 ($p = 0,05$) с продукцией цитокина IL-10. Корреляция с продукцией цитокина TNF α была выявлена у групп аллелей HLA-DRB1*04 ($p = 0,05$) и DRB1*12 ($p = 0,01$). Полученные результаты показывают, что полиморфизм генов HLA II класса может оказывать влияние на уровень секреции цитокинов в ответ на иммунизацию против чумы. Изучение генов, регулирующих продукцию факторов иммунитета, позволит улучшить понимание механизмов, лежащих в основе вариаций иммунного ответа после вакцинации, а также будет способствовать прогнозированию иммуногенности и эффективности разрабатываемых вакцинных препаратов.

Ключевые слова: специфическая профилактика чумы, полиморфизм генов HLA, иммунологическая эффективность.

AN ASSOCIATION BETWEEN PARAMETERS OF Th1 AND Th2 CELL-RELATED FUNCTIONAL ACTIVITY AND HLA GENE POLYMORPHISM IN INDIVIDUALS AFTER ANTI-PLAGUE VACCINATION

Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Goncharova A.Yu., Klyueva S.N., Shcherbakova S.A.

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

Abstract. In the Russian Federation, *Y. pestis* NIEG strain-based live attenuated vaccine is used for immunization against plague on epidemiological indications, displaying high efficiency. However, individual fluctuations in adaptive immunity

Адрес для переписки:

Кудрявцева Ольга Михайловна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8452) 26-21-31 (служебн.). Факс: 8 (452) 51-52-12.
E-mail: 3030774@mail.ru; rusrap@microbe.ru

Contacts:

Olga M. Kudryavtseva
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe».
Phone: +7 (8452) 26-21-31 (office). Fax: +7 (452) 51-52-12.
E-mail: 3030774@mail.ru; rusrap@microbe.ru

Библиографическое описание:

Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И.,
Гончарова А.Ю., Ключева С.Н., Щербаклова С.А. Ассоциация показателей
функциональной активности маркеров Th1 и Th2 иммунитета
с полиморфизмом генов HLA у лиц, вакцинированных против чумы //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 315–324. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-2-315-324

Citation:

Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I.,
Goncharova A.Yu., Klyueva S.N., Shcherbakova S.A. An association between
parameters of Th1 and Th2 cell-related functional activity and HLA gene
polymorphism in individuals after anti-plague vaccination // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2,
pp. 315–324. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-315-324

after vaccination necessitate conducting a search for genes underlying variability of developing immune response. Of note, HLA (Human Leukocyte Antigen) gene polymorphism plays an important role in this process. In our study, we identified HLA class II haplotypes for HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 in 120 residents of the territory of Pre-Caspian natural plague focus, who were immunized against plague. In addition, level of TNF α production correlated with detecting allelic groups HLA-DRB1*04 ($p = 0.05$) and DRB1*12 ($p = 0.01$). The data obtained show that HLA class II gene polymorphism can affect the level of cytokine secretion in response to plague immunization. Examining the genes regulating immune factor production will allow to get better insight into the mechanisms underlying immune response variations after vaccination as well as contribute to predicting immunogenicity and efficiency of developing vaccine preparations.

Key words: *specific plague prophylaxis, HLA gene polymorphism, immunological efficacy.*

Чума — острое инфекционное заболевание, относящееся к группе особо опасных карантинных инфекций (ООИ). Успехи, достигнутые в прошлом столетии в области профилактики и лечения ООИ позволяют стабильно поддерживать благополучную эпидемиологическую обстановку по заболеваемости чумой. Вместе с тем население, проживающее на территории природных очагов чумы в Российской Федерации, ежегодно подвергается риску заражения. Общая площадь участков, на которых в 2008–2017 гг. были выявлены эпизоотии чумы среди грызунов, составила более 1,9 тыс. км² [6]. Ситуация осложняется случаями заболевания чумой в сопредельных с Россией государствах, а также вероятностью завоза особо опасного инфекционного заболевания через транспортные и торговые потоки из стран Юго-Восточной Азии. Таким образом, при отсутствии санитарных противоэпидемических и профилактических мероприятий, чума может представлять реальную опасность и в настоящее время.

Согласно Национальному календарю профилактических прививок, в случае обострения эпидемиологической ситуации население Российской Федерации, проживающее на энзоотических по чуме территориях, подлежит вакцинации [5]. В качестве профилактического препарата используется вакцина чумная живая (ВЧЖ) на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, вызывающая развитие иммунитета длительностью до года. Плановым прививкам подлежат дети с 2 лет и взрослые, проживающие на энзоотических по чуме территориях, а также лица, работающие с живыми культурами возбудителя чумы.

При изучении функциональной активности клеточных и гуморальных факторов иммунитета у вакцинированных ВЧЖ людей наряду с общими тенденциями отмечают колебания индивидуальных показателей — продукции специфических антител (отсутствие 100% сероконверсии), цитокинового ответа, продолжительности периода сохранения иммунологической памяти и ряда других параметров [2, 7]. Принято считать, что иммунный ответ как результат активации или подавления IR-генов (Immune response genes) является тщатель-

но регулируемым процессом, формирующим иммунитет против инфекций. Полагают, что IR-гены входят в систему генов человеческого лейкоцитарного антигена (HLA — Human Leukocyte Antigen) главного комплекса гистосовместимости (МНС — Major Histocompatibility Complex) или тесно связаны с ней [24].

Несмотря на то что изучение влияния системы HLA на иммунный статус человека проводят уже более 20 лет, механизм этого взаимодействия полностью не изучен. Однако можно констатировать, что иммуногенетический статус влияет на эффективность специфического иммунного ответа, равно как и на характер течения самого заболевания, а исследование генетических маркеров повышает прогностическую ценность иммунологических исследований [2]. К настоящему времени выявлены ассоциации между особенностями HLA-фенотипа или гаплотипа и функциональной активностью защитных систем макроорганизма (иммуноглобулинов, цитокинов, компонентов комплемента и т.д.) [13, 20, 27]. Обнаружены популяционные и этнические особенности ассоциаций комплекса HLA с различными инфекционными заболеваниями, такими как острые респираторно-вирусные инфекции, вирусные гепатиты, а также бактериальные инфекции [10, 12, 26]. Однако поиск ассоциаций гаплотипов HLA с инфекционными заболеваниями усложнен, так как даже сформированные по признаку национальной принадлежности популяционные группы содержат разнообразный спектр вариантов генов HLA. Кроме того, необходимо помнить, что гены HLA — не единственный фактор, определяющий степень выраженности иммунного ответа, кроме него необходимо учитывать множество других предикторов, таких как пол, возраст, сопутствующие заболевания.

Ассоциация генов HLA с развитием специфического противочумного иммунитета в настоящее время является малоизученной областью. Связь между ответной реакцией организма на вакцинацию и фенотипом HLA была обнаружена при иммунизации вирусными вакцинами — против оспы, гриппа, кори, краснухи и эпидемического паротита [15, 17, 18, 23, 24]. Опубликованы данные по ассоциации между

различными гаплотипам HLA класса I (HLA-A) и класса II (HLA-DQA1 и HLA-DQB1) и клеточными иммунными реакциями у лиц, иммунизированных американской химической сибирезвеной вакциной AVA [19].

Целью нашего исследования было изучение полиморфизма генов MHC HLA класса II у лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы, вакцинированных (ревакцинированных) по эпидемическим показаниям ВЧЖ, и поиск ассоциаций HLA-гаплотипов с особенностями развития у них иммунных реакций.

Материалы и методы

Индикаторные группы. Клинические лабораторные исследования выполняли в соответствии с лицензией на медицинскую деятельность № ФС-64-01-001706 от 05.03.2015 г., выданной Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, на осуществление медицинской деятельности РосНИПЧИ «Микроб».

В исследовании приняли участие 120 добровольцев (44 мужчины и 76 женщин), проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы: город Астрахань — 40 человек (25 мужчин и 15 женщин), Республика Калмыкия (жители Лаганского и Черноземельского районов) — 80 человек (19 мужчин и 61 женщина). Медиана возраста составила 40 (33; 47) лет. Критерием включения в исследование было отсутствие противопоказаний к вакцинации ВЖЧ, а также возраст от 18 до 60 лет. Предварительно было проведено анкетирование людей индикаторной группы, от каждого волонтера было получено информированное согласие для участия в исследовании.

Иммунизация вакциной живой чумной. Все исследуемые лица были вакцинированы ВЧЖ (лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций, производство ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, серии 2–16 и 3–15), однократно накожно в дозе $2,4 \times 10^9$ живых микробных клеток в 0,15 мл (в соответствии с инструкцией по применению). Вакцинацию осуществляли в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами «Профилактика чумы» СП 3.1.7.2492-09.

Взятие и транспортировка крови для исследования. Взятие крови у лиц, подлежащих вакцинации (ревакцинации) ВЖЧ, проводили до и через 1, 6 и 12 месяцев после иммунизации ВЧЖ. Манипуляции по забору крови выполнял сертифицированный персонал медицинской организации, имеющей лицензию

на этот вид медицинской деятельности в соответствии с инструкцией по забору биологического материала для исследования иммунного статуса человека (Приказ Минздрава РФ № 380 от 25.12.97). В соответствии со стандартом ГОСТ Р 53079.4-2008 забор венозной крови осуществляли в вакуумные пробирки Vacutest KIMA (Италия), содержащие антикоагулянт (гепарин 20 МЕ на мл или К3ЭДТА 3,6 мг).

Получение проб для определения спонтанной и митогениндуцированной продукции маркерных цитокинов, их транспортировка и хранение. Для оценки уровня продукции цитокинов венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин) разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ФГУП им. Н.А. Семашко, Россия). В один из опытных образцов вносили T-клеточный митоген конканавалин А (Sigma, США), в концентрации 15 мкг/мл, в контрольный — физиологический раствор. Опытный и контрольный образцы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Далее клетки осаждали центрифугированием при 1500 об./мин (400g) в течение 15 мин. Полученные супернатанты замораживали, и хранили до исследования при температуре –20°C. Для количественного определения маркерных цитокинов IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 и IL-17 использовали сертифицированные наборы реагентов (Вектор-Бест, Россия или eBioscience, Австрия) в соответствии с инструкцией по их применению. Учет результатов осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Lazurite» (Dynex Technologies Inc., США).

Типирование генов гистосовместимости человека (HLA) II класса DRB1, DQA1 и DQB1 методом амплификации ДНК. Для исследования использовали венозную кровь человека с антикоагулянтом К3-ЭДТА. ДНК выделяли с помощью сертифицированного комплекта реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ДНК-Технология, Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Типирование генов главного комплекса гистосовместимости проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-Прайм (ДНК-Технология, Россия) с применением комплектов реагентов HLA-ДНК-ТЕХ для детекции аллелей локусов DQA1, DQB1 и DRB1 (ДНК-Технология, Россия).

Статистические методы исследования. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью стандартного пакета прикладных программ «Statistica 10.0 (StatSoft Inc.)», в котором использовали модуль непараметрической ранговой корреляции Спирмена (Spearman, r) и дисперсионный анализ. Характер зависимости между аллельным полиморфиз-

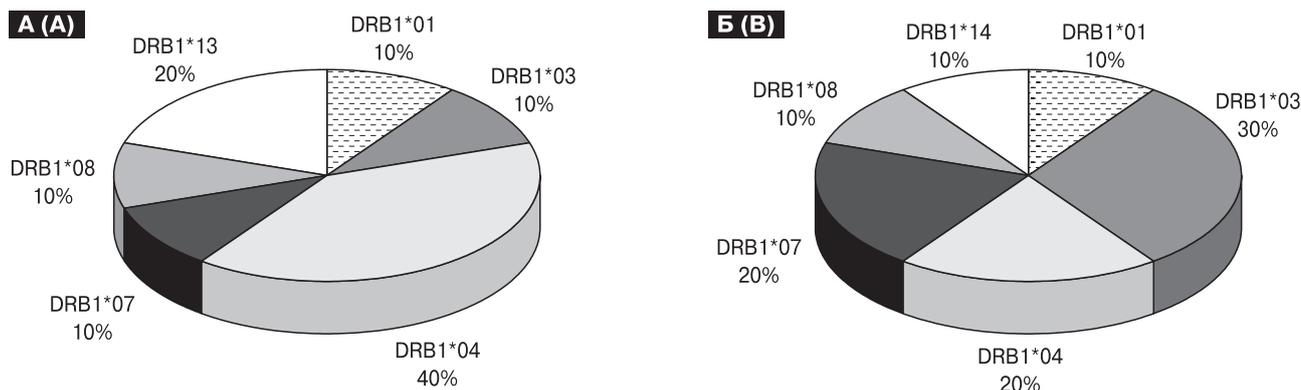


Рисунок 1. Соотношение аллелей локуса HLA-DRB1 у вакцинированных ВЧЖ людей в Лаганском (А) и Черноземельском (Б) районах Республики Калмыкия, %, n = 20

Figure 1. HLA-DRB1 locus allele ratio in individuals vaccinated with live-attenuated vaccine in the Lagansky (A) and Chernozemelsky (B) regions of the Republic of Kalmykia, %, n = 20

мом локусов HLA и продукцией цитокинов определяли методом регрессионного анализа. Интервальную оценку коэффициента корреляции (доверительный интервал) отображали линейным уравнением регрессии. Корреляцию считали достоверной при $p \leq 0,05$. Аллели генов HLA группировали в гаплотипы и суммировали с использованием медиан и межквартильных диапазонов.

Результаты

Нами были определены гаплотипы MHC класса II: HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 улиц, вакцинированных (ревакцинированных) по эпидемическим показаниям ВЧЖ среди жителей Лаганского (г. Лагань) и Черноземельского (п. Артезиан) районов Республики Калмыкия и города Астрахань. На начальных этапах в исследовании приняли участие 20 человек (17 женщин и 3 мужчин, в возрасте от 24 до 53 лет, проживающих г. Лагань и п. Артезиан. Медиана

возраста составила 46,3 (41–50,5) лет. Основная часть группы (85%) была представлена калмыками, но среди обследованных были русские (10%) и татары (5%).

В ходе экспериментов по определению гаплотипов HLA класса II была выявлена разница в распределении аллельных вариантов локуса DRB1 по районам проживания. Из 13 предполагаемых вариантов в Лаганском районе преобладала группа аллелей DRB1*04, в Черноземельском — DRB1*03. Реже встречались группы DRB1*01, *08, *07, *13 и *14 (рис. 1).

Для характеристики иммунологической перестройки в организме иммунизированных ВЧЖ лиц проводили оценку уровней продукции Th1- (IFN γ , TNF α), Th2- (IL-4, IL-10) и Th17- (IL-17) ассоциированных цитокинов. Было отмечено, что продукция цитокинов в исследованных группах различалась по районам проживания. Через 1 месяц после второй ревакцинации у респондентов из Черноземельского района отмечали более высокие уровни про-

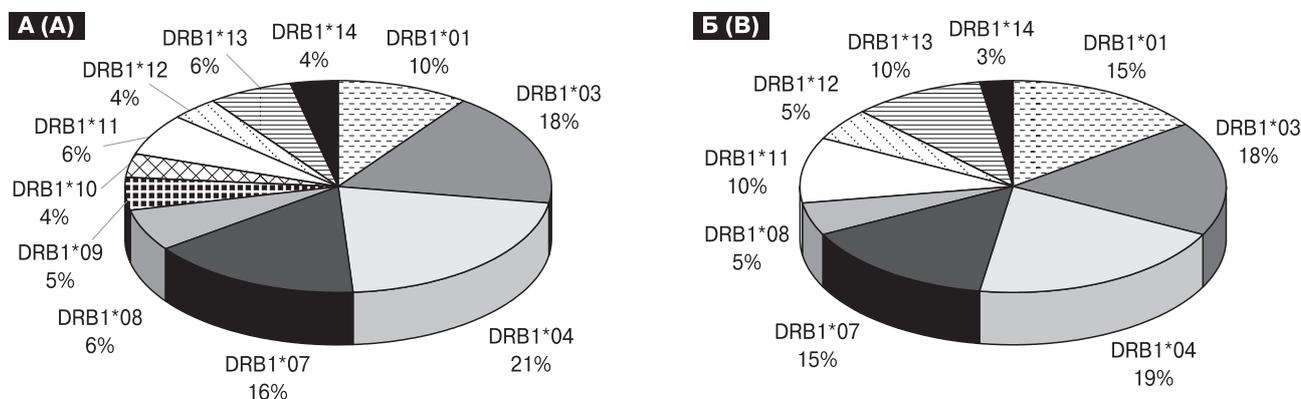


Рисунок 2. Соотношение аллелей локуса HLA- DRB1 у вакцинированных людей в Черноземельском районе Республики Калмыкия (А) и в г. Астрахань (Б), %, n = 100

Figure 2. HLA-DRB1 locus allele ratio in individuals vaccinated in the Chernozemelsky region of the Republic of Kalmykia (A) and in City of Astrakhan (B), %, n = 100

дукции IL-4 и IFN γ . В эти же сроки у жителей Лаганского района отмечали более высокие уровни продукции TNF α и IL-10 [4].

Дальнейшая работа по изучению связи полиморфизма генов МНС HLA II класса с продукцией Th1- и Th2-ассоциированных цитокинов при вакцинации ВЧЖ предполагала расширение охвата обследуемых лиц. На следующем этапе в исследовании приняли участие еще 60 человек из Черноземельского района Республики Калмыкия и 40 человек из города Астрахань, вакцинированных ВЧЖ по эпидемическим показаниям. Общее число волонтеров составило 120 человек, 80 из которых — жители Лаганского и Черноземельского районов Калмыкии и 40 человек — жители города Астрахань. Основная группа была представлена калмыками (50%), русскими (22,5%) и казахами (15,8%), присутствующие среди обследованных лиц татары, даргинцы, кумыки, армяне составляли от 1 до 5%.

В результате типирования по 13 группам аллелей гена HLA-DRB1 у жителей Черноземельского района чаще других были отмечены аллели HLA-DRB1*04, *03, *07, *01. У жителей города Астрахани данные группы аллелей также встречались чаще других, примерно в том же соотношении (рис. 2).

При проведении комплексного иммунологического исследования не было отмечено значительной разницы между показателями Th1- (IFN γ , TNF α), Th2- (IL-4, IL-10) и Th17- (IL-17) ассоциированных цитокинов у обследованных людей как в Республике Калмыкия, так и в г. Астрахань.

При анализе связей гаплотипов HLA DRB1-DQA1-DQB1 с продукцией Th1- и Th2-ассоциированных цитокинов была выявлена корреляция ($r = 0,44$) продукции цитокина IL-10 с группами аллелей гена HLA-DRB1 у жителей Астрахани ($p = 0,0049$). Также нами была выявлена корреляция групп аллелей гена HLA-DRB1 с уровнем продукции цитокина TNF α , ($r = 0,45$) с достоверностью $p = 0,0005$ у всех обследуемых лиц. Скрининг продукции IFN γ , IL-4 и IL-17 не позволил выявить статистически достоверной взаимосвязи с гаплотипами HLA-DRB1-DQA1-DQB1.

На следующем этапе проводили более детальный анализ ассоциации аллелей локусов HLA II класса с продукцией цитокинов IL-10 и TNF α . Корреляция наблюдаемого уровня IL-10 была выявлена с группами аллелей HLA-DRB1*01 ($p = 0,03$), HLA-DRB1*03 ($p = 0,01$), HLA-DRB1*07 ($p = 0,01$) и HLA-DRB1*11 ($p = 0,05$) (табл.).

Среди указанных групп аллелей более высокая продукция IL-10 наблюдалась у лиц с гаплотипами HLA-DRB1*0104-DQA1*0101,0301-

DQB1*0501 ($Me = 83,4$), HLA-DRB1*0315-DQA1*01,0501-DQB1*02 ($Me = 26,5$).

Детальный анализ корреляционных связей выявил ассоциацию групп аллелей HLA-DRB1*04 с продукцией цитокина TNF α ($p = 0,05$). Значения TNF α у этой группы в среднем были выше, чем у остальных волонтеров ($Me = 17,4$). Группа аллелей HLA-DRB1*12 ассоциировалась ($p = 0,01$) с несколько меньшей продукцией TNF α ($Me = 12,8$).

Обсуждение

Ключевым маркером формирования противочумного иммунитета является активация клеточного звена иммунной системы. Ситуацию *in vivo* наиболее адекватно отражает активация различных типов иммунокомпетентных клеток, продуцирующих ряд биомаркерных цитокинов. Изменение характера секреции цитокинов позволяет получить информацию о формировании иммунного ответа по Th1-, Th2- или смешанному типу. Однако необходимо помнить, что первичный иммунный ответ начинается с образования комплекса Т-зависимого антигенного пептида и HLA-рецептора на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Именно этот комплекс и распознается Т-лимфоцитом [8]. Полиморфизм генов системы МНС HLA находится в сложной ассоциации с генами, продукты которых вовлечены в ответы иммунной системы [22]. Поиск ассоциаций между полиморфизмом генов МНС HLA и продукцией цитокинов — биомаркеров Th1- и Th2-опосредованных типов иммунного ответа у людей после вакцинации (ревакцинации) ВЧЖ представляет интерес, поскольку оценка баланса между уровнем секреции различных биомаркерных цитокинов косвенно характеризует эффективность специфического ответа иммунитета у вакцинированных лиц [9].

Обнаруженная нами ассоциация варианта HLA-DRB1*01 с продукцией IL-10 при вакцинации ВЧЖ согласуются с данными литературы [16]. Так, при изучении взаимодействия Т-клеток гуманизированных мышей со встроенным в геном локусом HLA-DRB1 с эпитопами антигена Caf1 *Y. pestis* авторами было отмечено, что лучший Т-клеточный ответ вызывал эпитоп Caf1, ассоциированный с геновариантом HLA-DRB1*01. Кроме того, при изучении связи полиморфизма HLA и реакции цитокинов на иммунизацию вакциной против кори было выявлено, что полиморфизм HLA-DRB1 оказывает влияние на продукцию биомаркеров иммунного ответа, в том числе IL-10 при иммунизации [20]. Ген IL10 локализован на 1 хромосоме (1q31–32) [3, 11]. Продукт гена — противо-

Таблица. Индуцированная продукция цитокинов IL-10 и TNF у обследованных лиц после вакцинации (ревакцинации)

Table. IL-10 and TNF induced production in individuals after plaque vaccination (revaccination)

Галлотипы HLA DRB1-DQA1-DQB1 Haplotypes HLA DRB1-DQA1-DQB1	n = 120	Продукция IL-10 IL-10 production		Продукция TNF TNF production	
		Me (Q25–Q75)	p	Me (Q25–Q75)	p
DRB1*01	14	4,45 (2,5–37,5)	0,03	4,45 (2,5–37,5)	0,03
*0104-*0101,0301-*0501	2	83,4 (4,6–237,4)		83,4 (4,6–237,4)	
*0107-*0101,0201-*02,0501	6	3,65 (2,2–54,1)		3,65 (2,2–54,1)	
*0108-*0101-*0501	2	5,55 (2,9–34,3)		5,55 (2,9–34,3)	
*0111-*0101,0501-*0302,0501	2	35,1 (2,6–60,5)		35,1 (2,6–60,5)	
*0115-*0101,0102-*0501,0602-8	2	4,75 (4,4–40,1)		4,75 (4,4–40,1)	
DRB1*03	21	4,9 (2,5–33,8)	0,01	4,9 (2,5–33,8)	0,01
*0304-*0301,0501-*02	2	2,7 (0,7–46,3)		2,7 (0,7–46,3)	
*0307-*0201,0501-*02,02	7	6,4 (3,5–33,9)		6,4 (3,5–33,9)	
*0309-*0301,0501-*0303	2	25,7 (0,8–77,9)		25,7 (0,8–77,9)	
*0310-*0101,0501-*02,0501	1	5,0 (2,5–13,4)		5,0 (2,5–13,4)	
*0311-*0501,0501-*02,0301	1	2,3 (1,4–3,3)		2,3 (1,4–3,3)	
*0312-*0501,0601-*02,0301	1	6,2 (3,6–52,5)		6,2 (3,6–52,5)	
*0314-*0501-*02	3	6,1 (2,55–43,2)		6,1 (2,55–43,2)	
*0315-*01,0501-*02	4	26,5 (3,7–79,9)		26,5 (3,7–79,9)	
DRB1*04	25	6,3 (3,2–34,8)	0,74	6,3 (3,2–34,8)	0,74
*0404-*0301-*0301	3	5,8 (3–31,7)		5,8 (3–31,7)	
*0407-*0201,0301-*0203	2	5,2 (3–45,3)		5,2 (3–45,3)	
*0408-*0301-*03	4	9,4 (5,3–68,1)		9,4 (5,3–68,1)	
*0410-*0101,0301-*0302,0501	1	76,7 (11,1–219,1)		76,7 (11,1–219,1)	
*0411-*0301,0501-*0301,0302	3	13,8 (3,2–46,3)		13,8 (3,2–46,3)	
*0412-*0103,0601-*0301,0301	1	2,9 (2,5–31,7)		2,9 (2,5–31,7)	
*0413-*0301-*03	3	4,4 (3,3–30,6)		4,4 (3,3–30,6)	
*0414-*0301-*03	2	31,9 (3,2–55,7)		31,9 (3,2–55,7)	
*0415-*0102,0301-*0602-8	4	9,7 (3,8–134,1)		9,7 (3,8–134,1)	
*0416-*0102,0301-*03,0502/0504	2	15,7 (2,9–61,5)		15,7 (2,9–61,5)	
DRB1*07	19	5,1 (2,7–22,14)	0,01	5,1 (2,7–22,14)	0,01
*0708-*0103,0201-*02,0601	1	4,9 (4,2–44,6)		4,9 (4,2–44,6)	
*0709-*0201,0301-*02,0303	2	4,8 (3,2–38,9)		4,8 (3,2–38,9)	
*0711-*0201,0501-*02,0303	5	4,5 (3,0–48,2)		4,5 (3,0–48,2)	
*0713-*0103,0201-*0303,0602-8	6	4,9 (2,6–35,5)		4,9 (2,6–35,5)	
*0714-*0201-*02	3	16,9 (5,6–66,1)		16,9 (5,6–66,1)	
*0715-*0102,0201-*02,0602-8	2	22,1 (1,5–64,3)		22,1 (1,5–64,3)	

Гаплотипы HLA DRB1-DQA1-DQB1 Haplotypes HLA DRB1-DQA1-DQB1	n = 120	Продукция IL-10 IL-10 production		Продукция TNF TNF production	
		Me (Q25-Q75)	p	Me (Q25-Q75)	p
DRB1*08	7	5,6 (2,5-54,7)	0,59	5,6 (2,5-54,7)	0,59
*0808-*0301/0401-*0302/0401	2	5,1 (3,5-39,3)		5,1 (3,5-39,3)	
*0811-*0301,0501-*0301,0302	1	62,3 (36,8-88,9)		62,3 (36,8-88,9)	
*0813-*0103,0103-*0601,0602-8	1	5,4 (2,1-31,1)		5,4 (2,1-31,1)	
*0815-*0102/0301-*0602-8	3	15,7 (2,3-84,7)		15,7 (2,3-84,7)	
DRB1*09	4	5,3 (3,4-9,1)	0,68	5,3 (3,4-9,1)	0,68
*0913-*0103,0301-*0303,0602-8	1	5,6 (3,4-10,1)		5,6 (3,4-10,1)	
*0914-*0101,0301-*0303,0502/0504	2	6,2 (2,9-23,4)		6,2 (2,9-23,4)	
*0915-*0103,0301-*0303,0601	1	15,7 (5,4-26,2)		15,7 (5,4-26,2)	
DRB1*10	3	4 (3,3-17,5)	0,66	4 (3,3-17,5)	0,66
*1010-*0101,0101-*0501,0501	1	5,2 (3,7-83,5)		5,2 (3,7-83,5)	
*1011-*0103,0301-*0301,0501	1	35,1 (2,4-67,8)		35,1 (2,4-67,8)	
*1012-*0101,0501-*0301,0501	1	14,2 (3,3-25,2)		14,2 (3,3-25,2)	
DRB1*11	9	4,7 (3-14,6)	0,05	4,7 (3-14,6)	0,05
*1111-*0101,0501-*0301,0503	1	5,1 (3,6-38,1)		5,1 (3,6-38,1)	
*1112-*0501-*0301,0301	3	4,8 (3,4-42,7)		4,8 (3,4-42,7)	
*1113-*0501-*0301,0602-8	3	3,5 (2,3-64,79)		3,5 (2,3-64,79)	
*1115-*0102,0501-*0301,0602-8	1	3,8 (3,6-24,9)		3,8 (3,6-24,9)	
*1116-*0102,0501-*0301,0502/0504	1	3,1 (0,2-102,4)		3,1 (0,2-102,4)	
DRB1*12	5	4,2 (2,5-10,1)	0,79	4,2 (2,5-10,1)	0,79
*1213-*0102,0301-*0302,0602-8	1	6,3 (1,9-60,7)		6,3 (1,9-60,7)	
*1214-*00501-*0301	2	3,4 (2,5-86,8)		3,4 (2,5-86,8)	
*1215-*0102/0103,0601-*0301	2	5,55 (3,2-60,39)		5,55 (3,2-60,39)	
DRB1*13	9	5 (3,4-34,4)	0,77	5 (3,4-34,4)	0,77
*1312-*0102,0102-*0602-8	1	5,4 (3,7-39,18)		5,4 (3,7-39,18)	
*1313-*0102,0103-*0602-8	2	14,8 (2,8-34,5)		14,8 (2,8-34,5)	
*1314-*0101,0301-*0502/0504,0602-8	1	4,1 (3,4-63,1)		4,1 (3,4-63,1)	
*1315-*0102/0103-*0602-8	4	8,9 (2,9-42)		8,9 (2,9-42)	
*1316-*0102/0103-*0502/0504,0602-8	1	2,8 (2,1-107,9)		2,8 (2,1-107,9)	
DRB1*14	4	12,9 (3,55-60,34)	0,74	12,9 (3,55-60,34)	0,74
*1415-*0102-*0602-8	3	17,8 (4,1-64,39)		17,8 (4,1-64,39)	
*1416-*0101,0102-*0502/0504	1	6,5 (3,5-69,8)		6,5 (3,5-69,8)	

воспалительный цитокин IL-10 оказывает влияние на экспрессию антигенов HLA класса II на макрофагах, увеличивает количество продуцирующих IL-4 Т-клеток и повышает выживаемость и пролиферацию В-клеток и, следовательно, производство антител [14].

Выявленная нами ассоциация аллелей гена HLA DRB1 с продукцией TNF α вполне закономерна, так как ген TNF входит в кластер генов главного комплекса гистосовместимости на 6 хромосоме (6p23-q12) [11]. Более того, установлено неравновесие по сцеплению между рядом точечных мутаций гена TNF и аллелями MHC [3]. Возможно, выявленная нами ассоциация более высокой продукции TNF α с присутствием в геноме аллели DRB1*04 у людей, вакцинированных ВЧЖ, также связана с полиморфизмом гена TNFA. Цитокин TNF α играет одну из ключевых ролей в формировании иммунитета — активирует макрофаги и способствует презентации антигенов посредством HLA класса II.

Выявление ассоциаций аллелей HLA с иммунными реакциями на вакцинацию может способствовать отбору иммунодоминантных эпитопов, которые инициируют иммунные реакции. Современные методологии позволяют выявлять эпитопы, образующие комплекс со специальной структурой HLA-рецептора. Изучение именно этих эпитопов обозначило новое направление в конструировании субъединичных вакцин [25]. Показано, что молекулами, представляющими антигены Т-клеткам, являются HLA-DR [21]. Таким образом, иммуногенность и протективность разрабатываемых вакцин должны быть определены в контексте полиморфизмов HLA-DR.

Сведения об эпитопах антигенов возбудителя чумы, ассоциированных с развитием Т-клеточного иммунного ответа, немногочисленны. С использованием биоинформационных ресурсов было отобрано 178 эпитопов, входящих в состав 113 белков *Y. pestis*, потенциально способных вызывать специфический ответ CD8 Т-клеток [28]. Полученные знания о новых

иммуногенных эпитопах *Y. pestis* внесут вклад в определение рационального дизайна будущих вакцин.

Заключение

Таким образом, нами определены аллельные варианты гаплотипов MHC II класса HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 у людей, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Выявлена ассоциация указанных гаплотипов с показателями биомаркеров Th1- и Th2-опосредованного иммунного ответа на вакцинацию ВЧЖ. Полученные результаты показывают, что полиморфизм генов HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 может оказывать влияние на уровень секреции цитокинов.

Дальнейшее изучение генов, принимающих участие в регуляции уровня продукции основных факторов иммунитета, наряду с иммунологическими методами, позволит улучшить понимание механизмов, лежащих в основе вариаций иммунного ответа после вакцинации. Выявление связи аллельного полиморфизма генов HLA с показателями маркеров клеточного и гуморального звеньев иммунитета способствует отбору иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов, что позволит повысить иммуногенность и эффективность разрабатываемых вакцинных препаратов.

Благодарности

Руководство и специалисты ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» выражают искреннюю благодарность руководству и сотрудникам Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, ФКУЗ «Элистинская противочумная станция», ФКУЗ «Астраханская противочумная станция» за организацию, регулярную помощь и участие в сборе материала для исследований.

Список литературы/References

1. Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Микшис Н.И., Ключева С.Н., Кудрявцева О.М., Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Бембеева Е.С., Щербак С.А., Кутырев В.В. Комплексное иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в Республике Калмыкия // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17, № 3 (100). С. 38–49. [Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Kudryavtseva O.M., Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Bembeeva E.S., Shcherbakova S.A., Kutyrer V.V. Comprehensive immunological study of persons vaccinated with live plague vaccine living on the territory of the Pre-Caspian sand foci of the plague in the Republic of Kalmykia. *Epidemiologiya i vaksino-profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2018, vol. 17, no. 3 (100), pp. 38–49. doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50 (In Russ.)]
2. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хаитов Р.М. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 880 с. [Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M. Vaccines and vaccinations: national guidelines. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2011. 880 p. (In Russ.)]

3. Конненков В.И. Смольникова М.В. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Медицинская Иммунология. 2003. Т. 5, № 1–2. С. 11–28. [Konnenkov V.I., Smolnikova M.V. Structural bases and functional significance of allelic polymorphism of genes of human cytokines and their receptors. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, vol. 5, no. 1–2, pp. 11–28. (In Russ.)]
4. Кудрявцева О.М., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И., Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Щербаква С.А. Выявление ассоциаций генов HLA II класса главного комплекса гистосовместимости с особенностями иммунного ответа у лиц, вакцинированных живой чумной вакциной в Республике Калмыкия // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 3. С. 95–99. [Kudryavtseva O.M., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Sanjiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A., Shcherbakova S.A. Identification of associations of HLA class II genes of the main histocompatibility complex with immune response characteristics in persons vaccinated with live plague vaccine in the Republic of Kalmykia. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 3, pp. 95–99. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-95-99 (In Russ.)]
5. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 125н, 2014. [On the approval of the national calendar of preventive vaccinations and the calendar of preventive vaccinations for epidemiological indications. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 125n, 2014]
6. Попов Н.В., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Вершинин С.А., Косилко С.А., Иннокентьева Т.М., Григорьев М.П., Дегтярев Д.Ю., Герасименко Е.В., Дубянский В.М., Шилов М.М., Топорков В.П., Зенкевич Е.С., Попов В.П., Лопатин А.А., Безсмертный В.Е., Балахонov С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2008–2017 гг. и прогноз на 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. № 1. С. 50–55. [Popov N.V., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Vershinin S.A., Kosilko S.A., Innokent'eva T.M., Grigor'ev M.P., Degtyarev D.Yu., Gerasimenko E.V., Dubyansky V.M., Shilov M.M., Toporkov V.P., Zenkevich E.S., Popov V.P., Lopatin A.A., Bezsmertny V.E., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutuyev V.V. Epizootic activity of natural plague foci of the Russian Federation in 2008–2017 and forecast for 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2018, no. 1, pp. 50–55. doi: 10.21055/0370-1069-2018-1-50-55 (In Russ.)]
7. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015. № 3. С. 62–68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbатов A.A., Savchenko T.B., Tjurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 3, pp. 62–68. doi: 10.14427/jipai.2015.3.62 (In Russ.)]
8. Хаитов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 280 с. [Khaitov R.M. Immunology: structure and functions of the immune system: a textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 280 p. (In Russ.)]
9. Щуковская Т.Н., Смолькова Е.А., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Бугоркова С.А. Индуцированная продукция IFN и IL-4 как показатель функциональной активности Th1- и Th2-клеток у вакцинированных против чумы людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. Т. 6, № 61. С. 78–83. [Shchukovskaya T.N., Smolkova E.A., Shmelkova T.P., Klueva S.N., Bugorkova S.A. Induced production of IFN and IL-4 as an indicator of functional activity human Th1 and Th2 cells after plague vaccination. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2011, vol. 6, no. 61, pp. 78–83. (In Russ.)]
10. Blackwell J.M., Jamieson S.E., Burgner D. HLA and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009, vol. 22, no. 2, pp. 370–385. doi: 10.1128/CMR.00048-08
11. Campbell R.D., Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol. Today*, 1993, vol. 14, no. 7, pp. 349–352. doi: 10.1016/0167-5699(93)90234-C
12. Hohler T., Reuss E., Evers N., Dietrich E., Rittner C., Freitag C.M., Vollmar J., Schneider P.M., Fimmers R. Differential genetic determination of immune responsiveness to hepatitis B surface antigen and to hepatitis A virus: a vaccination study in twins. *Lancet*, 2002, vol. 360, no. 9338, pp. 991–995. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11083-X
13. Jin P., Wang E. Polymorphism in clinical immunology – from HLA typing to immunogenetic profiling. *J. Translat. Med.*, 2003, vol. 1, no. 1, pp. 8–19. doi: 10.1186/1479-5876-1-8
14. Kikuchi K., Lian Z.X., Kimura Y., Selmi C., Yang G.X., Gordon S.C., Invernizzi P., Podda M., Coppel R.L., Ansari A.A., Ikehara S., Miyakawa H., Gershwin M.E. Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.*, 2005, vol. 24, no. 4, pp. 347–352. doi: 10.1016/j.jaut.2005.03.002
15. Lambkin R., Novelli P., Oxford J., Gelder C. Human genetics and responses to influenza vaccination: clinical implications. *Am. J. Pharmacogenomics*, 2004, vol. 4, no. 5, pp. 293–308.
16. Musson J.A., Ingram R., Durand G., Ascough St., Waters E.L., Hartley M.G., Robson T., Maillere B. Repertoire of HLA-DR1-restricted CD4 T-cell responses to capsular Caf1 antigen of *Yersinia pestis* in human leukocyte antigen transgenic mice. *Infection and Immunity*, 2010, vol. 78, no. 10, pp. 4356–4362. doi: 10.1128/IAI.00195-10
17. Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M., Vierkant R.A., O'Byrne M.M., Poland G.A. Replication of rubella vaccine population genetic studies: validation of HLA genotype and humoral response associations. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 49, pp. 6926–6931. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.109
18. Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Vierkant R.A., Jacobson R.M., Poland G.A. Consistency of HLA associations between two independent measles vaccine cohorts: a replication study. *Vaccine*, 2012, no. 30, pp. 2146–2152. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.038
19. Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Vierkant R.A., Pajewski N.M., Quinn C.P., Kaslow R.A., Jacobson R.M., Poland G.A. Human leukocyte antigens and cellular immune responses to anthrax vaccine adsorbed. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 7, pp. 2584–2591. doi: 10.1128/IAI.00269-13

20. Ovsyannikova I.G., Ryan J.E., Jacobson R.M., Vierkant R.A., Pankratz V.S., Poland G.A. Human leukocyte antigen and interleukin 2, 10 and 12p40 cytokine responses to measles: is there evidence of the HLA effect. *Cytokine*, 2006, vol. 36, no. 3–4, pp. 173–179. doi: 10.1016/j.cyto.2006.12.001
21. Ovsyannikova I.G., Vierkant R. A., Poland G.A. Importance of HLA-DQ and HLA-DP polymorphisms in cytokine responses to naturally processed HLA-DR-derived measles virus peptides. *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 25, pp. 5381–5389. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.034
22. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M. Vaccine immunogenetics: bedside to bench to population. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 49, pp. 6183–6188. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.057
23. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M., Smith D.I. Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clinical Pharmacol. Ther.*, 2007, vol. 82, no. 6, pp. 653–664. doi: 10.1038/sj.clpt.6100415
24. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Haralambieva I.H., Jacobson R.M. Vaccinomics and a new paradigm for the development of preventive vaccines against viral infections. *OMICS*, 2011, vol. 15, no. 9, pp. 625–636. doi: 10.1089/omi.2011.0032
25. Poland J.A., Ovsyannikova I.G., Johnson K.L., Naylor S. The role of mass spectrometry in vaccine development. *Vaccine*, 2001, vol. 19, no. 17–19, pp. 2692–2700. doi: 10.1016/S0264-410X(00)00505-3
26. Tian C., Hromatka B.S., Kiefer A.K., Eriksson N., Noble S.M., Tung J.Y., Hinds D.A. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, no. 1, p. 599. doi: 10.1038/s41467-017-00257-5
27. Wang C., Tang J., Song W., Lobashevsky E., Wilson C.M., Kaslow R.A. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology*, 2004, vol. 39, no. 4, pp. 978–988. doi: 10.1002/hep.20142
28. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 44, pp. 5995–6006. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092

Авторы:

Кудрявцева О.М., к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Бугоркова С.А., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Щуковская Т.Н., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Микшис Н.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Гончарова А.Ю., к.м.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Клюева С.Н., к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Щербакова С.А., д.б.н., зам. директора по научной и экспериментальной работе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия.

Authors:

Kudryavtseva O.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Shchukovskaya T.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Mikshis N.I., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Goncharova A.Yu., PhD (Medicine), Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Klyueva S.N., PhD (Biology), Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Shcherbakova S.A., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Scientific and Experimental Work, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.06.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 10.04.2019

Received 22.06.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 10.04.2019

ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ КОРИ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫМИ МАТЕРЯМИ (КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ)

Н.Ф. Снегова¹, М.П. Костинов^{2,3}, Д.В. Пахомов², Н.И. Ильина¹

¹ ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА, Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Проблема вакцинации детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, вакцинами Национального календаря профилактических прививок актуальна. При этом в настоящее время наблюдается значительный рост заболеваемости корью, особенно в прослойке невакцинированных детей. Применение живой противокоревой вакцины у ВИЧ-инфицированных и детей ВИЧ-инфицированных матерей имеет ряд особенностей, вызванных иммуносупрессивным действием ВИЧ, и не было достаточно изучено. Проводилось наблюдение за 212 детьми возраста 12–36 месяцев, рожденными ВИЧ-инфицированными женщинами. 184 ВИЧ-негативных ребенка, рожденных ВИЧ-инфицированными женщинами, после верификации диагноза попали в группу с диагнозом «Перинатальный контакт по ВИЧ-инфекции» (R75). 28 детей включены в группу «ВИЧ-инфекция» (B23). 42 ребенка составили группу контроля. Для вакцинации использовалась живая коревая вакцина (ЖКВ) подкожно в дозе 0,5 мл. Детей наблюдали 36 недель. Проводилось исследование ВИЧ-статуса, антител к кори методами ИФА и РПГА и определение общих иммуноглобулинов классов А, М, G и субпопуляций лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺. Не было зарегистрировано ни одного случая поствакцинальных осложнений или тяжелых вакцинированных реакций в группе ВИЧ-инфицированных пациентов. Выявлено удовлетворительное течение вакцинального процесса у всех детей ВИЧ-инфицированных матерей, существенно не отличавшееся от группы здорового контроля. Дети с перинатальным ВИЧ-контактом способны давать адекватный ответ на вакцинацию ЖКВ. Число детей с защитными, условно защитными уровнями и оставшихся серонегативными среди детей с перинатальным ВИЧ-контактом (R75) сопоставимо с группой здорового контроля (ГК). В то же время дети с перинатальной трансмиссией ВИЧ лишь в 36,4% случаев синтезировали защитный уровень антител на введение ЖКВ, остальные 63,6% имели условно защитный уровень или не синтезировали специфических антител вовсе (в сравнении с 76% детей с перинатальным ВИЧ-контактом). Дети с перинатальной ВИЧ-инфекцией, не ответившие на первое введение ЖКВ, синтезировали низкое количество антител на повторное введение вакцины. Сероконверсия зарегистрирована не более чем в 68% случаев, а защитный уровень имели не более 33,6% детей. Напротив, дети из группы перинатального ВИЧ-контакта имели защитные антитела в 69,6% случаев при частоте сероконверсии 91,3%, что не отличало их

Адрес для переписки:

Пахомов Дмитрий Владимирович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 917-41-49.
E-mail: dm_pachomov@mail.ru

Contacts:

Dmitry V. Pakhomov
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazenny Lane, 5a,
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 917-41-49.
E-mail: dm_pachomov@mail.ru

Библиографическое описание:

Снегова Н.Ф., Костинов М.П., Пахомов Д.В., Ильина Н.И. Вакцинация против кори детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями (клинико-иммунологические аспекты) // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 325–336. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-325-336

Citation:

Snegova N.F., Kostinov M.P., Pakhomov D.V., Ilyina N.I. Measles vaccination of children born to HIV-infected mothers (clinical and immunological aspects) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 325–336. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-325-336

от группы контроля. В поствакцинальном периоде мы наблюдали формирование тенденции к усилению супрессивной направленности иммунных реакций, о чем косвенно может свидетельствовать повышение CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, дети, рожденные ВИЧ-инфицированными матерями, вакцинация, корь, вакцина.

MEASLES VACCINATION OF CHILDREN BORN TO HIV-INFECTED MOTHERS (CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS)

Snegova N.F.^a, Kostinov M.P.^{b,c}, Pakhomov D.V.^b, Ilina N.I.^a

^a National Research Center — Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

^b Federal State-Funded Science Institution Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^c Federal State-Funded Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Vaccination of children born to HIV-infected mothers in accordance with the national Calendar of preventive vaccinations represents an important issue. Upon that, measles incidence rate especially among unvaccinated children has been substantially elevated. Use of live measles vaccine in both HIV-infected children and mothers has some features primarily due to HIV-associated immunocompromised state that was poorly investigated. Here we monitored 212 children aged 12–36 months born to HIV-infected women, 184 HIV-negative children born to HIV-infected women who were included into the group with the diagnosis “Perinatal HIV contact” (R75) after verification. In addition, 28 children were included into the group” HIV infection “(B23), whereas 42 children — into the control group. Live measles vaccine was administered subcutaneously at a dose of 0.5 ml. All children were followed up for 36 weeks. HIV status, measles antibodies level by measured by ELISA and RPG methods, as well as total immunoglobulin A, M, G classes and CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ lymphocyte counts were examined. No post-vaccination complications or severe vaccine-induced reactions were reported in HIV-infected patients group. A satisfactory course of the vaccine process in all children born to HIV-infected mothers was observed that did not significantly differ from that one in control group. Children with perinatal HIV contact are able to respond adequately to vaccination with live measles vaccine. The number of children with conditionally protective antibody levels, still remaining seronegative among children with perinatal HIV contact (R75) was comparable to that one in healthy control group. At the same time, children with perinatal HIV contact were shown to display protective antibody level after administering live measles vaccine only in 36.4% of cases, whereas the remainder (63.6%) demonstrated a conditionally protective antibody level or lack it (compared to 76% of children with perinatal HIV contact). Children with perinatal HIV infection who did not respond to the first administered live measles vaccine produced low amount of antibodies after re-vaccination. Seroconversion was observed in up to 68% of cases, whereas protective antibody level was found in up to 33.6% of children. On the contrary, children from the perinatal HIV contact group were shown to have protective antibody level in 69.6% of cases upon seroconversion rate reaching 91.3% that did not differ them from those in control group. In the post-vaccination period, suppressive modality of immune reaction tended to increase indirectly evidenced by increased percentage of CD8⁺ T cell subset.

Key words: HIV-infection, children born to HIV-infected mothers, vaccination, measles, vaccine.

В России и за рубежом количество ВИЧ-инфицированных людей продолжает оставаться довольно значительным, несмотря на все принятые государственные профилактические меры. После 2000 г. количество родов, принятых у ВИЧ-инфицированных, увеличилось почти в 10 раз: с 668 в 2000 г. до 6365 в 2004 г. (в целом по стране 0,5%), у девочек-подростков — более чем в 20 раз. Показатель перинатальной смертности среди родившихся у ВИЧ-инфицированных матерей колеблется в пределах 20–25 на 1000 родившихся живыми и мертвыми. Во время беременности у 31% женщин не проводилась профилактика вертикальной передачи ВИЧ-инфекции, во время родов — у 12%. В результате скрининговых и профи-

лактических мероприятий в РФ перинатальное инфицирование ВИЧ уменьшилось с 20 до 10% (в США — в 4 раза, до 1–2%). Тестирование на ВИЧ беременных женщин регламентируется приказом МЗ России от 10.02.2003 г. «О совершенствовании акушерско-гинекологической помощи в амбулаторно-поликлинических отделениях», предусмотрено двукратное бесплатное исследование (ИФА) на ВИЧ [9].

Отмечена положительная динамика реализации мероприятий перинатальной передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку (ППМР) с 2012 по 2015 г.: увеличение охвата химиопротекцией на I этапе (с 87,1 до 88,8%); на II этапе (с 93,4 до 94%); на III этапе (с 98 до 99%); увеличение доли пар «мать–ребенок», получивших

3-этапную химиопрофилактику (с 85,5 до 87,2%) [9]. Тем не менее количество детей с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции за весь период наблюдения составило 145 287 [6]. Эти дети, как и остальное детское население, нуждается в профилактических мероприятиях по снижению инфекционной заболеваемости, в первую очередь во введении профилактических прививок согласно Российскому Национальному календарю. Введение живых аттенуированных вакцин против кори, краснухи и эпидемического паротита таким детям регламентировано в возрасте 12 месяцев. При этом следует отметить, что таким пациентам рекомендуется определять уровень антител спустя 6 месяцев после вакцинации для определения необходимости введения бустер-доз лицам, не имеющих протективных уровней антител. Это особенно необходимо исследовать в настоящее время, поскольку в Российской Федерации продолжают регистрироваться случаи заболевания корью, несмотря на массовую вакцинопрофилактику. В 2016 г. заболеваемость корью в РФ составила 162 случая (из них 16 — в Москве), или 1,12 на 100 тыс. человек, так же был выявлен 21 импортированный случай из других государств [11]. В 2017 г. в РФ наблюдался значительный рост заболеваемости корью — 725 случаев, из которых 332 случая зафиксировано в Москве (221 — дети и 111 — взрослые). Несмотря на отсутствие данных по клиническому состоянию (наличие сопутствующих заболеваний) среди заболевших корью, можно предположить, что у таких лиц, кроме отсутствия вакцинации в анамнезе, причиной инфицирования могло служить и наличие дефектов в иммунном ответе, связанном с различными нарушениями состояния здоровья, среди которых могли быть и ВИЧ-контактные или ВИЧ-инфицированные пациенты.

Применение живой аттенуированной противокоревой вакцины у ВИЧ-инфицированных пациентов до некоторых пор считалось опасным. Однако исследования показали, что риск возникновения осложнений в ближайшие недели после коревой вакцинации, в целом не имел отличий у ВИЧ-инфицированных и неинфицированных [21, 22]. Известно большое число случаев заболевания корью, вызванной диким вирусом, среди больных с нарушениями клеточного иммунитета, включая ВИЧ-инфицированных пациентов. Корь может иметь очень тяжелое и прогрессирующее течение и приводить к осложнениям, таким как гигантоклеточная пневмония, диарея или энцефалит с высоким процентом летального исхода и инвалидности тех, кто остается жив. Как и многие другие инфекционные болезни, корь имеет более тяжелое течение у людей с ВИЧ-инфекцией

[26, 27, 28, 30]. У ВИЧ-инфицированных детей смертность от кори может достигать 40–70%, в том числе и в странах с развитой медициной, что в десятки раз выше, чем у здоровых детей [23, 24, 25]. Все это привело к пересмотру АСІР тактики вакцинации против кори ВИЧ-инфицированных детей [29].

Показатели сероконверсии к вирусу кори у ВИЧ-инфицированных детей после прививки в разных исследованиях варьировали от 25 до 57%. Среди больных СПИДом, привитых против кори, сероконверсии наблюдались только у 36%, а среди асимптоматичных детей сероконверсии имели место у 77% привитых. Серологический ответ на вторую прививку варьировал, но в целом был слабым [17, 18, 19, 20]. При этом уровень антител у ВИЧ-инфицированных привитых против кори падал быстрее, чем у здоровых детей и, в среднем, исчезновение антител происходило через 30 месяцев. В ходе ретроспективного исследования в США было установлено, что через 5–6 месяцев после иммунизации антитела к вирусу кори имелись только у 60% ВИЧ-инфицированных детей [17].

В РФ противокоревую моно- или дивакцину рекомендуют вводить ВИЧ-инфицированным детям с 12-месячного возраста независимо от стадии заболевания и возможности развития нежелательных явлений [10]. Кроме этого, у детей с подтвержденным диагнозом «ВИЧ-инфекция» при решении вопроса о вакцинации необходимо учитывать стадию заболевания, отсутствие вторичного иммунодефицитного состояния. Несмотря на то что в практике здравоохранения вакцинация таких пациентов проводится и не вызывает сомнения, тем не менее исследований по изучению эффективности применения отечественных вакцин у данного контингента лиц недостаточно. Возможно, анализ проведенный в настоящем исследовании, будет являться дополнительным доказательным методом оценки безопасности иммунизации против кори ВИЧ-контактных и ВИЧ-инфицированных детей.

Цель исследования — изучить иммунологические параметры клеточного иммунитета и уровней противокоревых антител у вакцинированных ВИЧ-контактных и ВИЧ-инфицированных детей.

Материалы и методы

Проводилось наблюдение за 212 детьми, рожденными ВИЧ-инфицированными женщинами. 184 ВИЧ-негативных ребенка, рожденных ВИЧ-инфицированными женщинами, после верификации диагноза попали в группу с диагнозом «Перинатальный контакт по ВИЧ-

инфекции» (R75). 28 детей включены в группу «ВИЧ-инфекция» (B23). 42 ребенка составили группу контроля.

Дизайн исследования предусматривал отбор пациентов в соответствии с разработанными нами критериями включения и исключения.

Критерии включения: дети обоего пола, до 36-месячного возраста с подтвержденным диагнозом «ВИЧ-инфекция»; дети обоего пола от 1 до 36 месяцев, рожденные от ВИЧ-инфицированных матерей; наличие подписанного информированного согласия родителей и/или опекуна.

Критерии исключения: наличие у пациента хотя бы одного из нижеперечисленных состояний: острые инфекционные заболевания, в том числе туберкулез; активная фаза хронического вирусного гепатита; психические расстройства (психоз); почечная или печеночная недостаточность; злокачественные новообразования; хронические заболевания в стадии обострения; гиперчувствительность к компонентам вакцины; тяжелые осложнения на предшествующие вакцинации; уровень CD4⁺ клеток менее 200 в мкл; неспособность родителей (опекуна) понять цели и задачи исследования и/или подписать информированное согласие.

Критерии исключения из исследования: нарушение Протокола; возникновение у участника исследования заболевания или состояния, указанного в критериях исключения; возникновение нежелательного явления, вынуждающего прекратить проведение вакцинации по графику; по желанию родителей/опекунов.

Для вакцинации использовалась живая коревая вакцина (ЖКВ) АО «НПО «Микроген» (Россия), вводилась подкожно в дозе 0,5 мл.

При проведении исследования родители знакомились и подписывали 2 экземпляра Информированного согласия.

В индивидуальную регистрационную карту вносились сведения семейного и индивидуального анамнеза. В ходе каждого визита проводился физикальный осмотр и термометрия. Собиралась информация об интеркуррентных заболеваниях и любых нежелательных явлениях, возникших с момента последнего обращения. Период клинического наблюдения составлял не менее 12 месяцев после каждой прививки.

Матери пациентов ежедневно в течение 2 недель измеряли и регистрировали температуру и любые неблагоприятные явления. Кроме того, проводился опрос родителей вакцинированных детей об общем самочувствии, аппетите, сне и др. В случае серьезных нежелательных явлений родители пациентов имели возможность экстренно связаться с исследователем.

В группе вакцинированных детей изучались все виды реакций, возникающие после введения вакцин, в том числе и реакции, предусмотренные инструкцией по применению препарата.

Учитывались серьезное и несерьезное действие вакцин, то есть изменение функции органов и систем после прививок, не связанное с развитием специфической невосприимчивости. Развитие после прививки острого заболевания или обострения хронического может иметь причинно-следственную связь с прививкой, но может быть и просто совпадением.

В работе использованы методы, необходимые для лабораторной характеристики ВИЧ-инфекции и иммунологической эффективности проведенной вакцинации. Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) определялись методом ИФА в тест-системе D-0152 фирмы «Вектор-Бест» согласно инструкции.

Иммунный блоттинг (ИБ). Метод ИФА по определению антител к ВИЧ является скрининговым. При получении положительного результата для подтверждения его специфичности используют метод иммуноблоттинга. Western-blot — встречная преципитация в геле антител в сыворотке крови больного с различными вирусными белками, подвергнутыми разделению по молекулярной массе с помощью электрофореза и нанесенными на нитроцеллюлозу. Определяются антитела к вирусным белкам gp41, gp120, gp160, p24, p18, p17 и др. По рекомендации Российского центра по профилактике и борьбе со СПИДом обнаружение антител к одному из гликопротеинов — gp41, gp120, gp160 — следует считать положительным результатом.

Определение уровней иммуноглобулинов классов А, М, G сыворотки крови выполняли по методу Манчини (1965 г.).

Определение субпопуляций лимфоцитов крови CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ (методом лазерной проточной цитометрии). Исследование субпопуляций лимфоцитов проводили с помощью моноклональных антител ИСО производства НПЦ «МедБиоСпектр» на лазерном цитометре «Facs Can» (Becton Dickinson) по общепринятой методике [29].

Исследование парных сывороток по наличию специфических антител к кори, проводилось централизованно и одновременно сотрудниками лабораторий вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний, иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Анализ на антитела к вирусу кори проводился методом ИФА с использованием тест-системы фирмы «Биосервис». Результаты регистрировались с помощью оптического спектрофотометра на длине волны 492 нм. Сыворотка оценивалась как положительная при превышении разницы оптической плотности более 0,2 ед. ОП.

Антитела к вирусу кори также определяли общепринятым методом реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Защитными считались титры 1:20.

Обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере в статистическом пакете прикладных программ Statistica 6.0. При анализе полученных результатов определяли средние величины и стандартную ошибку ($M \pm m$). Достоверность различий результатов исследования устанавливали с помощью критерия Стьюдента для выборок с нормальным распределением. Для выборок, не соответствующих критериям нормального распределения, достоверность различий определялась непараметрическими методами [18].

Результаты

В первой группе — ВИЧ-контактные (отрицательные) — было вакцинировано 19 из 184 детей, не имевших клинических и/или серологических признаков ВИЧ-инфекции, с отрицательными результатами ПЦР-обследования. В дальнейшем эти дети с перинатальным ВИЧ-контактом были сняты с учета, а при описании эта группа обозначена нами, как «перинатальный контакт по ВИЧ-инфекции» (R-75).

Вторая группа — ВИЧ-инфицированные (B23) — дети с перинатальной трансмиссией ВИЧ. Диагноз ВИЧ-инфекции у детей установлен в ходе динамического наблюдения на основании данных анамнеза, клинической симптоматики и результатов комплекса клинико-лабораторных методов исследования реакций иммуноферментного анализа (ИФА), подтвержденный в иммунном блоте (ИБ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Вакцинировано против кори 22 из 28 детей этой группы.

Третью группу, группу контроля (ГК), составили дети, рожденные от ВИЧ-серонегативных матерей. Из них вакцинировано против кори 28 из 42 детей.

Средний возраст вакцинированных детей по группам значительным образом не различался и составил в группе R75 $1,23 \pm 0,03$ года, в группе B23 $1,61 \pm 0,05$ года, а в группе сравнения $1,33 \pm 0,02$ года.

У большинства детей (81,7%) течение поствакцинального процесса не сопровождалось развитием побочных реакций. Нежелательные явления в течение поствакцинального периода, преимущественно в виде наслоения интеркуррентных заболеваний или обострения atopических проявлений, регистрировалось у пациентов в 18,3% случаев, достоверно не различаясь по группам ($p > 0,05$). Местные реакции встречались в единичных случаях.

ВИЧ-инфицированные дети имели ряд исходных иммунологических особенностей. Следует отметить, что среди наблюдаемых ВИЧ-инфицированных не было не только больных СПИДом, но большая часть из них относилась к категории «A1» (слабо выраженные клинические симптомы) или «B1» (умеренные клинические симптомы) (в соответствии с классификацией CDC 1994 г.) или II A–B (в соответствии с Российской классификацией 2001 г.). Однако отсутствие или слабая выраженность симптомов инфекции сопровождалась иммунологическими изменениями. В этой группе исходно (до вакцинации) имела место гипериммуноглобулинемия (табл. 1). Содержание неспецифического IgG составило $1266,25 \pm 99,87$ мг%, в сравнении с $471,82 \pm 65,48$ мг% у детей с R-75 и $357,14 \pm 56,57$ мг% группы сравнения, то есть в 2,5–3 раза превышая аналогичные показатели групп сравнения. Показатели IgA ($153,66 \pm 49,35$) в 3–5 раз превышали аналогичные показатели в группе R75 ($p < 0,001$) и ГК ($p < 0,05$). Уровень IgM ($189,75 \pm 50,20$ мг%) был выше в 1,9–2,4 раза ($p < 0,05$).

Исходные иммунологические параметры в группе R75 и ГК значительным образом не отличались (табл. 1), в то время как в группе B23 отмечалось снижение процентного содержания CD4⁺ субпопуляций лимфоцитов $29,30 \pm 1,69\%$ в сравнении с $35,14 \pm 1,73\%$ группы R75 и $34,67 \pm 1,73\%$ группы контроля ($p < 0,05$). Наблюдалось относительное увеличение CD8⁺ субпопуляций до $35,78 \pm 1,59\%$ в сравнении с $23,91 \pm 1,09\%$ в группе R75 и $23,38 \pm 1,09\%$ в ГК ($p < 0,001$).

Таким образом, проведенный анализ подтвердил наличие исходных иммунологических различий в исследуемых группах детей. У ВИЧ-инфицированных пациентов отмечалась инверсия соотношения CD4⁺/CD8⁺ преимущественно за счет повышения CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов. Количество CD19⁺ было также увеличено до $20,27 \pm 1,97\%$ в сравнении с $15,27 \pm 1,17\%$ в группе перинатального контакта и $14,67 \pm 1,17\%$ в ГК ($p < 0,05$). Несмотря на отклонения в иммунологических параметрах, лабораторных признаков иммунодефицитного состояния у ВИЧ-инфицированных детей не отмечалось. Количество иммунокомпетентных клеток CD4⁺ составило $1311,34 \pm 97,93 \times 10^6$ /л.

Однако «вирусная нагрузка», определенная у большинства детей к тому моменту, была весьма высокой и в среднем составляла $287435,73 \pm 58023,99$ копий/мкл. В связи с этим обстоятельством трем детям группы B23 инфекционистами назначена высокоактивная антиретровирусная терапия 3 препаратами (никавир + эпивир + вирамун или зерит + видекс + вирусепт) еще до момента вакцинации ЖКВ.

Таблица 1. Исходные иммунологические параметры у пациентов, подлежащих вакцинации против кори

Table 1. Baseline immunological parameters in patients eligible to measles vaccination

Показатели Parameters	Группы пациентов Groups of patients		
	R75 (n = 19)	B23 (n = 22)	ГК (n = 28) Control group (n = 28)
Лейкоциты Leukocytes	8359,09±1626,94	9646,66±0,59641	8457,14±626,94
Лимфоциты, % Lymphocytes	51,75±3,07	50,55±1,82	51,12±3,07
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	4230,77±349,89	4475,48±271,03	4237,24±349,89
CD3 ⁺ , %	62,40±1,47	68,34±1,41*	62,38±1,44*
CD3 ⁺ , абс. CD3 ⁺ , abs.	2680,91±247,8	3089,91±211,29	2685,71±247,85
CD4 ⁺ , %	35,14±1,73	29,30±1,69*	34,67±1,73 [#]
CD4 ⁺ , абс. CD4 ⁺ , abs.	1539,64±177,39	1311,34±97,93	1525,19±177,39
CD8 ⁺ , %	23,91±1,09	35,78±1,59**	23,38±1,09 [#]
CD8 ⁺ , абс. CD8 ⁺ , abs.	1026,68±97,90	1558,61±111,86**	1007,33±97,91 [#]
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,5±0,088	0,818±0,102	1,53±0,08
CD19 ⁺ , %	15,27±1,17	20,27±1,97*	14,67±1,17 [#]
CD19 ⁺ , абс. CD19 ⁺ , abs.	614,14±72,55	849,27±94,67	588,76±72,55 [#]
IgA	44,62±5,06	273,18±35,62**	45,8±5,06 [#]
IgM	100,14±7,85	214,54±22,73**	103,05±7,85 [#]
IgG	653,86±36,67	1499,36±154,84**	664,55±36,67 [#]

Примечания. *p < 0,05, **p < 0,001 (достоверность различий показателей групп R75-B23); [#]p < 0,05, [#]#p < 0,001 (достоверность различий показателей групп R75-ГК).

Notes. *p < 0,05, **p < 0,001 (significant differences for parameters between the groups R75-B23); [#]p < 0,05, [#]#p < 0,001 (significant differences for parameters between the groups R75-control group).

Из данных, представленных в таблицах 1 и 2, видно, что в группе ВИЧ-инфицированных детей, основные иммунологические параметры: общее количество лимфоцитов, их основных субпопуляций, основных классов иммуноглобулинов, значительно не изменилось спустя 6 месяцев после прививки, сохраняя отличия с группами сравнения. Регистрировался повышенный уровень относительного показателя CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов — 37,83±3,98%, в сравнении с 23,0±1,93% (группа R75) и 27,75±4,19% (ГК) (p < 0,05). По-прежнему, наблюдалось уменьшение соотношения CD4⁺/CD8⁺ преимущественно за счет умеренного повышения CD8⁺ субпопуляций от 35,78±1,59 до 37,83±3,98%.

В ходе вакцинации в группе B23 зарегистрировано снижение содержания CD19⁺ лимфоцитов с 20,27 до 14,58% (p = 0,05), что не отличалось от групп сравнения.

Таким образом, коревой вакцинальный процесс у детей групп R75 и ГК сопровождался умеренным нарастанием иммуноглобулинов всех трех классов, однако лишь показатели IgA ГК достигли статистической значимости. В группе B23 исходная гипериммуноглобулинемия сохранялась на протяжении всего вакцинального процесса. Кроме того, отмечалось уменьшение количества В-лимфоцитов, а также умеренное нарастание субпопуляций CD8⁺ лимфоцитов и, как следствие, снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Нарастания «вирусной нагрузки» в процессе вакцинации ЖКВ не зарегистрировано. Спустя 6 месяцев после прививки, достоверных различий не отмечено, а средний показатель составил 278866±62802,6 копий/мкл.

Исходные показатели противокоревых антител, как и ожидалось, были равны 0 (РТГА) или определялись на уровне чувствительности метода (ИФА) (табл. 3, 4).

Таблица 2. Иммунологические параметры у пациентов через 6 месяцев после коревой вакцинации

Table 2. Immunological parameters in patients 6 months after measles vaccination

Показатели Values	Группы пациентов Groups of patients		
	R75 (n = 19)	B23 (n = 14)	ГК (n = 20) Control group (n = 20)
Лейкоциты Leucocytes	7625,00±755,05	9546,02±836,13	8683,33±1248,57
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	47,58±4,47	36,74±9,86	32,67±3,95
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	3450,75±423,35	3894,23±526,17	2531,67±246,05
CD3 ⁺ , %	64,5±2,83	67,46±4,789	55,8±5,86
CD3 ⁺ , абс. CD3 ⁺ , abs.	2299,17±348,34	3111,53±496,96	1689,8±122,28
CD4 ⁺ , %	38,75±2,58	30,28±3,69	37,8±1,56
CD4 ⁺ , абс. CD4 ⁺ , abs.	1382,58±231,31	1449,083±227,77	1050,75±69,26
CD8 ⁺ , %	23,0±1,93**	37,83±3,98**	27,75±4,19
CD8 ⁺ , абс. CD8 ⁺ , abs.	810,25±153,44**	1772,17±229,83**	752,75±106,71
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,81±0,17	0,8±0,23	1,34±0,18
CD19 ⁺ , %	14,0±1,21	14,58±2,009#	13,0±1,14
CD19 ⁺ , абс. CD19 ⁺ , abs.	553,25±54,30	621,583±108,29	480,2±73,48
IgA	54,43±6,64**	267,12±67,43* **	87,83±10,57* #
IgM	116,0±12,87**	277,32±35,93**	180,17±66,58
IgG	550,00±99,47**	1568,12±208,01* **	778,67±139,58*

Примечания. Достоверность различий: *p < 0,05 для групп B23-ГК; **p < 0,001 для групп R75-B23; #p < 0,05 сравнение с исходными показателями.

Notes. Significant differences found as follows: *p < 0.05 by comparing B23-control group; **p < 0.001 by comparing groups R75-B23;

#p < 0.05 by comparing with baseline parameters.

Таблица 3. Динамика поствакцинальных антител к кори у детей ВИЧ-инфицированных матерей и группы контроля, вакцинированных ЖКВ в ед. ОП (ИФА)

Table 3. Dynamics of post-vaccination anti-measles antibody level in children born to HIV-infected mothers and control group immunized with live measles vaccine (in optical density units, ELISA)

Группы Groups	Средние показатели противокоревых антител ед. ОП Average magnitude of anti-measles antibodies, optical density units			
	до вакцинации before vaccination	через 14 дней day 14	через 30–45 дней day 30–45	через 6 месяцев month 6
R75	0,018±0,012	0,1006±0,0178	0,6677±0,0749	0,7012±0,0246
B23	0,035±0,0079	0,2594±0,0807	0,4612±0,0787	0,044±0,0029
ГК Control group	0,076±0,028	0,1264±0,0263	0,7236±0,0639	1,039±0,0156

Таблица 4. СГТ поствакцинальных антител к кори у детей ВИЧ-инфицированных матерей и группы контроля, вакцинированных ЖКВ (РТГА)

Table 4. Average geometric titer of post-vaccination antibody measles in children born to HIV-infected mothers and control group, immunized with live virus vaccine (reaction of passive hemagglutination)

Группы Groups	СГТ log ₂ Average geometric antibody titers log ₂			
	до вакцинации before vaccination	через 14 дней day 14	через 30–45 дней day 30–45	через 6 месяцев month 6
R75	0	0,7498±0,186	4,427±0,342	4,091±0,592
B23	0	1,328±0,737	2,171±0,458* **	1,733±0,436* **
ГК Control Group	0	1,713±0,201	4,523±0,212	4,732±0,343

Примечание. *p < 0,05 B23-R75; **p < 0,05 B23-ГК.

Note. *p < 0.05 B23-R75; **p < 0.05 by comparing B23-Control group.

Результаты ИФА коррелировали со значениями РТГА. Показатель оптической плотности $\geq 0,3$ ед. рассматривался как позитивный, стандартный «негативный» нейтрализующий титр $< 1:10$, а $\geq 1:10$ — за стандартный «позитивный».

В среднем, у всех привитых специфические антитела регистрировались уже на 14 день после вакцинации. Сохранялись и особенности, отмеченные для разных групп.

В группе R75 через две недели после вакцинации сероконверсия произошла в 7 (36,8%) случаях, а к 45 дню специфические антитела зарегистрированы у 18 (91,3%) детей. Большинство детей сформировали защитный уровень антител, в среднем составлявший $0,668 \pm 0,075$ ед. ОП (ИФА), в РТГА — 1:21. Вместе с тем серонегативными остались 8,7% пациентов, 21,7% детей имели условно защитный уровень антител, остальные — 69,6% имели защитный уровень. Следует отметить, что при катamnестическом обследовании более чем через 6 месяцев средние титры антител значительным образом не изменились и составили 1:17 (РТГА), а средний уровень антител составил $0,701 \pm 0,03$ ед. ОП (ИФА).

В группе ВИЧ-инфицированных сероконверсия зарегистрирована у 9 (40,9%) пациентов через 2 недели после вакцинации, а к 30–45 дню всего у 15 (68,2%) детей. Средний уровень специфических антител достиг условно защитного уровня к 30–45 дню и составил $0,461 \pm 0,079$ ед. ОП (ИФА).

Защитный уровень антител регистрировался не более чем в 8 (33,6%) случаях. 14 (63,6%) детей не имели защитного уровня, в том числе 7 (31,8%) детей остались серонегативными. Спустя полгода специфические антитела были полностью утрачены, и средний уровень стал сравним с довакцинальным $0,044 \pm 0,003$ ед. ОП, при титре антител в РТГА 1:3,2.

Четверым детям, оставшимся серонегативными после первой вакцинации, через месяц проведена повторная прививка против кори. Через месяц после второй прививки средний показатель специфических антител составил $0,27 \pm 0,098$ ед. ОП, не достигнув защитного уровня.

Иная картина отмечена в группе здорового контроля. Наблюдался замедленный синтез антител. К концу вакцинального периода средний уровень антител достиг защитного и составил $0,724 \pm 0,064$ ед. ОП, титр 1:23 (РТГА). При контрольном обследовании в катamnезе средний уровень антител заметно повысился до $1,039 \pm 0,016$ ед. ОП, титр 1:26 (РТГА).

Число серонегативных пациентов в ГК не превышало 2 (7,1%), с условно защитным уровнем — 4 (14,3%), остальные 22 (78,6%) имели высокие титры антител.

Обсуждение

Анализ сложившейся ситуации на современном этапе показал, что в отношении группы детей, рожденных ВИЧ-инфицированными женщинами, сохранялись расширенные толкования понятия «иммунодефицит». Однако известно, что даже ВИЧ-инфекция сама по себе не определяет наличие иммунодефицита.

При всем благополучии вакцинации в целом, вопрос о тактике вакцинации детей ВИЧ-инфицированных матерей, особенно живыми вакцинами, остается окончательно не решенным. Это обстоятельство определяется еще и тем, что в России вопрос о вакцинации детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, стал серьезной проблемой в последние годы, в связи с ростом числа инфицированных женщин детородного возраста и ростом вспышек коревой инфекции на территории РФ и стран Европы.

Вопрос о целесообразности вакцинации должен ставиться в зависимости от сравнительной оценки той пользы, которую она может принести, и опасности осложнений, которые она может вызвать. В связи с этим особый интерес вызывает вопрос вакцинации против кори с использованием живой коревой вакцины и комбинированных вакцин [23].

Мы провели исследование переносимости вакцинации (ЖКВ) как у детей с перинатальным ВИЧ-контактом, так и у детей с перинатальной ВИЧ-инфекцией.

В ходе наших исследований показано, что переносимость вакцинации инактивированными вакцинами у ВИЧ-инфицированных детей оказалась хорошей. Не было зарегистрировано ни одного случая поствакцинальных осложнений или тяжелых вакцининдуцированных реакций в группе ВИЧ-инфицированных пациентов. Выявлено удовлетворительное течение вакцинального процесса у всех детей ВИЧ-инфицированных матерей, существенно не отличавшееся от группы здорового контроля. У большинства детей (81,7%) его течение было гладким и, преимущественно, бессимптомным (72,1%). Нежелательные явления в виде наложения интентуррентных инфекций возникали с одинаковой частотой у ВИЧ-инфицированных пациентов в группе В23 (36,4%) и группе контроля (21,4%) ($p > 0,05$).

ВИЧ-инфицированные дети имеют характерные особенности гуморального звена иммунитета в виде выраженной гипериммуноглобулинемии и клеточных изменений в виде инверсии соотношения $CD4^+/CD8^+$ за счет тенденции к повышению $CD8^+$ субпопуляций лимфоцитов.

Повышенное содержание иммуноглобулинов (специфических и неспецифических) может являться как компенсаторной реакцией при снижении функциональной активности клеточного иммунитета, так и патологической реакцией, так как высокое их содержание способствует образованию ЦИК, и может поддерживать нарушение здоровья детей, задержку психофизического развития, способствовать развитию лимфоаденопатии и гепатоспленомегалии. Высокие исходные показатели иммуноглобулинов являются косвенным критерием, позволяющим заподозрить ВИЧ-инфекцию у ребенка на раннем этапе, до появления специфических иммунологических маркеров. При первичном обследовании антитела к антигенам гепатита В (64,7%) и С (85,7%) выявляли как у ВИЧ-инфицированных, так и в группе R75 (44,7 и 67,4% соответственно) [3].

Нами не было выявлено прямой корреляционной зависимости между клиническими симптомами тяжести состояния и иммунным статусом у ВИЧ-инфицированных детей.

Изучение динамики иммунологических параметров в поствакцинальном периоде при введении различных антигенов (анатоксина и аттенуированной живой вакцины) позволило оценить адекватность специфического иммунного ответа на антигенную стимуляцию, иммунологическую безопасность иммунизации, выявить резервные, функциональные возможности иммунной системы указанных групп детей [7, 8, 12, 13, 14, 15].

Дети с перинатальным ВИЧ-контактом способны давать адекватный ответ на вакцинацию ЖКВ. Число детей с защитными, условно защитными уровнями и детей, оставшихся серонегативными, в группе с перинатальным ВИЧ-контактом (R75) сопоставимо с ГК.

В то же время дети с перинатальной трансмиссией ВИЧ лишь в 36,4% случаев синтезировали защитный уровень антител на введение ЖКВ, остальные 63,6% имели условно защитный уровень или не синтезировали специфических антител вовсе (в сравнении с 76% детей с перинатальным ВИЧ-контактом). Дети с перинатальной ВИЧ-инфекцией, не ответившие на первое введение ЖКВ, синтезировали низкое количество антител на повторное введение вакцины.

В отличие от ВИЧ-инфицированных детей, специфическое антителообразование в группах R75 значительным образом не нарушено и сопоставимо с ГК. Отмечалось различие темпов синтеза антител в группе R75 и ГК. Темпы синтеза антител в ГК могли быть снижены в связи с большим числом детей с атопией. Известно, что пациенты с атопией демонстрируют замедленный синтез специфических антител (37,87%). Это было доказано в других исследованиях, где выявлено, что дети с аллергическими заболеваниями, часто болеющие, продуцируют поствакцинальные антитела в более поздние сроки и в низких значениях [1, 16]. К тому же доказано, что после завершения курса вакцинации у иммунокомпromетированных пациентов формируется когорта серонегативных, составляющих группу риска по инфицированию [5].

В ходе проведенного исследования получены аналогичные результаты, где ВИЧ-инфицированные дети не отвечают (31,8%) или вырабатывают недостаточный уровень антител (34,6%) на стимуляцию аттенуированным вакцинным вирусом кори. Этот факт, с одной стороны, еще раз подтверждает, что «иммунокомпетентность» организма характеризуется не только количественными характеристиками иммунокомпетентных клеток реципиента, но и их функциональной активностью. С другой стороны, механизм формирования иммунного ответа (преимущественно клеточный или

гуморальный) определяется используемым антигеном. Факт сниженного количественного и качественного ответа на ЖКВ, короткая персистенция специфических антител, тяжелое течение натуральной инфекции позволяет отнести детей с перинатальной ВИЧ-инфекцией в группу риска и рекомендовать методы пассивной иммунопрофилактики в случае неблагоприятной эпидситуации.

Вакцинация ВИЧ-инфицированных детей, в основном эффективна, однако напряженность специфического иммунитета у таких детей ниже, чем у не инфицированных ВИЧ, а длительность сохранения специфических антител — короче. В проспективном исследовании сероконверсия зарегистрирована не более чем в 68% случаев, а защитный уровень имели не более 33,6% детей. Напротив, дети из группы перинатального ВИЧ-контакта имели защитные антитела в 69,6% случаев при частоте сероконверсии 91,3%, что не отличало их от группы контроля. Следует отметить, что в нашем исследовании не было ВИЧ-инфицированных детей с клинико-иммунологическими признаками иммунной недостаточности или СПИДом. Таким образом, уровень антител у ВИЧ-инфицированных, привитых против кори, был низким, и скорость его снижения была выше, чем у здоровых детей и детей с перинатальным ВИЧ-контактом. В среднем исчезновение антител происходило через 6 месяцев после проведенной вакцинации.

Мы попытались проанализировать причины слабого иммунного ответа на ЖКВ детей с перинатальной ВИЧ-инфекцией. В группе ВИЧ-инфицированных детей имела место тенденция к снижению числа Т-лимфоцитов за счет снижения относительного количества $CD4^+$ субпопуляции до 29,3% в сравнении с группой R75 (35,1%) и ГК (34,7%). Однако абсолютное количество иммунокомпетентных клеток $CD4^+$ было значительно больше 300. Наблюдалось относительное увеличение $CD8^+$ субпопуляций до 35,8% у ВИЧ-инфицированных в сравнении с 23% в двух других группах. Отмечалась инверсия соотношения $CD4^+/CD8^+$ преимущественно за счет повышения $CD8^+$. Несмотря на отклонения в иммунологических параметрах, лабораторных признаков иммунной недостаточности у ВИЧ-инфицированных детей не отмечалось. Однако «вирусная нагрузка», определенная у большинства детей к тому моменту была высокой и в среднем составляла $287435,73 \pm 58023,99$ копий/мкл.

В ходе динамического наблюдения иммунологические параметры группы B23 сохранили свои особенности. Отмечалась гипериммуноглобулинемия всех трех классов иммуноглобулинов, в 2,5–3 раза превышающая аналогичные

параметры в группах сравнения. Наблюдался повышенный уровень относительного показателя $CD8^+$ субпопуляций лимфоцитов — $37,83 \pm 3,98$ (B23) в сравнении с $23,0 \pm 1,93$ у детей с перинатальным контактом (R75) и $27,75 \pm 4,19$ в ГК ($p < 0,05$).

Вирусная нагрузка на фоне вакцинального процесса значимо не изменилась и составила $278866 \pm 62802,6$ копий/мкл.

В поствакцинальном периоде мы наблюдали формирование тенденции к усилению супрессивной направленности иммунных реакций, о чем косвенно может свидетельствовать повышение $CD8^+$ субпопуляций лимфоцитов. Возможно, что высокая активность супрессорных клеток как за счет повышения их количества, так, вероятно, и за счет повышенной их функциональной активности вследствие поликлональной активации ВИЧ, высокой вирусной нагрузки, сопровождается недостаточным специфическим антителообразованием у ВИЧ-инфицированных детей.

Эти свидетельства еще раз подтверждают предположения о глубине клеточного поражения у пациентов с перинатальной ВИЧ-инфекцией.

Вопрос о выборе тактики вакцинации детей ВИЧ-инфицированных матерей встает в первые часы после рождения, когда нет точных сведений по ВИЧ-статусу новорожденного и прогноз неизвестен. Проведенные исследования отечественных и зарубежных авторов показали, что начало вакцинации с рождения, а также на первом году жизни с использованием инактивированных вакцин безопасно, хотя уровень антител может регистрироваться ниже, чем в группе здоровых детей [20, 21, 22, 23, 24, 25]. Мониторинг уровней поствакцинального иммунитета является ведущим в определении тактики вакцинации, то есть использования дополнительных доз вакцин для создания защиты против управляемых инфекций [2].

Заключение

На основании вышеизложенного мы рекомендуем вакцинировать детей с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок с последующим контролем уровня антител через 6 месяцев. Детям с клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции и/или лабораторными признаками иммунодефицита (общее число лимфоцитов менее $1000 \times 10^6/л$ или $CD4^+$ лимфоцитов менее 25% от возрастной нормы) введение живых вакцин против кори, краснухи, паротита противопоказано. В случае контакта с корью рекомендовано проведение иммуноглобулинопрофилактики.

Список литературы/References

1. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Под ред. М.П. Костинова. 4-е изд., М.: 4Мпресс, 2013. 432 с. [Vaccination of children with impaired health. Ed. Kostinov M.P. 4th ed. Moscow: 4Mpress, 2013. 432 p. (In Russ.).]
2. Вакцины и вакцинация: Национальное руководство. Под ред. В.В. Зверева, Р.М. Хаитова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Vaccines and vaccination: national guide. Eds. Zverev V.V., Haitov R.M. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 640 p. (In Russ.).]
3. ВИЧ-инфекция. Клинико-диагностические и лечебно-профилактические аспекты. Под ред. М.П. Костинова, М.Н. Папуашвили, М.В. Сухинина. М.: Боргес, 2004. 128 с. Серия «Социально значимые заболевания». [HIV infection. Clinical, diagnostic and therapeutic aspects. Eds. Kostinov M.P., Papuashvili M.N., Suhinin M.V. Series "Socially significant diseases". Moscow: Borges, 2004. 128 p. (In Russ.).]
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 460 с. [Glants S. Biomedical statistics. Moscow: Praktika, 1999. 460 p. (In Russ.).]
5. Иммуномодуляторы и вакцинация. Под ред. М.П. Костинова, И.Л. Соловьёвой. М.: 4Мпресс, 2013. 272 с. [Immuno-modulators and vaccination. Eds. Kostinov M.P., Solov'yova I.L. Moscow: 4Mpress, 2013. 272 p. (In Russ.).]
6. Ковальчук Л.В., Череев А.Н. Актуальные проблемы оценки иммунной системы человека на современном этапе // Иммунология. 1990. № 5. С. 4–5. [Koval'chuk L.V., Cheredeev A.N. Actual problems of assessing the human immune system at the present stage. *Immunologiya = Immunology*, 1990, no. 5, pp. 4–5. (In Russ.).]
7. Костинов М.П., Пахомов Д.В., Снегова Н.Ф., Никитина Т.И., Зинкина Т.Н., Хромова И.Е. Проблема вакцинации детей, рождённых от ВИЧ-инфицированных матерей // Детские инфекции. 2005. Т. 4, № 2. С. 31–33. [Kostinov M.P., Pahomov D.V., Snegova N.F., Nikitina T.I., Zinkina T.N., Hromova I.E. The problem of vaccination of children born from HIV-infected mothers. *Detskie infekcii = Children Infections*, 2005, vol. 4, no. 2, pp. 31–33. (In Russ.).]
8. Костинов М.П., Снегова Н.Ф. Вакцинация детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей // Аллергология и иммунология. 2013. № 2. С. 58–68. [Kostinov M.P., Snegova N.F. Vaccination of children born from HIV-infected mothers. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2013, no. 2, pp. 58–68. (In Russ.).]
9. Латышева И.Б., Додонов К.Н., Воронин Е.Е. Влияние клинико-социальных факторов ВИЧ-инфицированных женщин на риск перинатальной передачи ВИЧ // Русский медицинский журнал. 2014. Т. 22, № 14. С. 1034–1038. [Latysheva I.B., Dodonov K.N., Voronin E.E. The impact of clinical and social factors of HIV-infected women on the risk of perinatal HIV transmission. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2014, vol. 22, no. 14, pp. 1034–1038. (In Russ.).]
10. Мониторинг поствакцинальных осложнений и их профилактика: методические указания МУ 3.3.1.1123-02 от 26 мая 2002 года. [Monitoring postvaccinal'nyh oslozhnenij i ih profilaktika: guidelines MU 3.3.1.1123-02. May, 26, 2002]
11. Об эпидемиологической ситуации по кори в Российской Федерации в 2016 году: письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 24 апреля 2017 года № 01/5110-17-32. [Epidemiological situation of measles in the Russian Federation in 2016: letter of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, April, 24, 2017, No. 01/5110-17-32]
12. Пахомов Д.В., Костинов М.П., Поддубиков А.В., Ванеева Н.П., Снегова Н.Ф., Никитина Т.Н., Зинкина Т.Н., Сулоева С.В. Безопасность и иммунологические эффекты вакцинации ВИЧ-инфицированных детей против пневмококковой инфекции // Педиатрия. 2009. Т. 88, № 5. С. 85–89. [Pahomov D.V., Kostinov M.P., Poddubikov A.V., Vaneeva N.P., Snegova N.F., Nikitina T.N., Zinkina T.N., Suloeva S.V. Safety and immunological effects of vaccinating HIV-infected children against pneumococcal infection. *Pediatriya = Pediatrics*, 2009, vol. 88, no. 5, pp. 85–89. (In Russ.).]
13. Пахомов Д.В., Костинов М.П., Поддубиков А.В., Ванеева Н.П., Снегова Н.Ф., Никитина Т.Н., Зинкина Т.Н., Сулоева С.В. Иммунологический эффект вакцинации против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных детей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 2. С. 48–52. [Pahomov D.V., Kostinov M.P., Poddubikov A.V., Vaneeva N.P., Snegova N.F., Nikitina T.N., Zinkina T.N., Suloeva S.V. Immunological effect of vaccination against pneumococcal infection in HIV-infected children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009, no. 2, pp. 48–52. (In Russ.).]
14. Пахомов Д.В., Снегова Н.Ф., Костинов М.П. К проблеме эффективности вакцинации детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, и ВИЧ-инфицированных детей против пневмококковой инфекции. Риски и преимущества // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005. Т. 24, № 5. С. 53–54. [Pahomov D.V., Snegova N.F., Kostinov M.P. To the problem of the effectiveness of vaccination of children born to HIV-infected mothers and HIV-infected children against pneumococcal infection. Risks and benefits. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2005, vol. 24, no. 5, pp. 53–54. (In Russ.).]
15. Снегова Н.Ф., Костинов М.П., Пахомов Д.В. Опыт вакцинации против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных детей и детей ВИЧ-инфицированных матерей // Вопросы современной педиатрии. 2006. Т. 5, № 1. С. 539–540. [Snegova N.F., Kostinov M.P., Pahomov D.V. Experience of vaccination against pneumococcal infection in HIV-infected children and children of HIV-infected mothers. *Voprosy sovremennoj pediatrii = Current Pediatrics*, 2006, vol. 5, no. 1, pp. 539–540. (In Russ.).]
16. Соловьёва И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск: УлГУ, 2006. 296 с. [Solov'yova I.L., Kostinov M.P., Kusel'man A.I. Features of vaccination of children with a modified premorbid background against hepatitis B, measles, and mumps. *Ul'yanovsk: Ul'yanovsk State University*, 2006. 296 p. (In Russ.).]
17. Харит С.М., Рулева А.А., Голева О.В., Калиногорская О.С., Апрытина В.А. Результаты сочетанного введения вакцины против гриппа и вакцин национального календаря прививок у детей с соматической патологией и иммунодефицитными состояниями // Вопросы современной педиатрии. 2014. Т. 13, № 1. С. 148–154. [Kharit S.M., Ruleva A.A., Goleva O.V., Kalinogorskaya O.S., Apryatina V.A. Results of the immunization according to the national calendar associated with vaccination against influenza in children with somatic disorders and immunodeficiency. *Voprosy sovremennoj pediatrii = Current Pediatrics*, 2014, vol. 13, no. 1, pp. 148–154. doi: 10.15690/vsp.v13i1.926 (In Russ.).]

18. Al-Attar I., Reisman J., Muehlmann M. Decline of measles antibody titers after immunization in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1995, vol. 14, pp. 149–151.
19. Arpadí S.M., Markowitz L.E., Baughman A.L. Measles antibody in vaccinated human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatrics*, 1996, vol. 97, no. 5, pp. 653–657.
20. Brena A.E., Cooper E.R., Cabral H.J. Antibody response to measles and rubella vaccine by children with HIV infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 1993, vol. 6, no. 10, pp. 1125–1129.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Measles in HIV-infected children, United States. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 1988, vol. 37, pp. 183–186.
22. Centers for Disease Control and Prevention. Measles pneumonitis following measles-mumps-rubella vaccination of patient with HIV infection: 1993. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 1996, vol. 45, pp. 603–606.
23. Current Trends Measles United States, 1990. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 1991, vol. 40, no. 22, pp. 369–372.
24. Epidemiologic notes and reports measles in HIV-infected children, United States. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 1988, vol. 37, no. 12, pp. 183–186.
25. Friedman S. Measles in New York City. *JAMA*, 1991, vol. 266, no. 9, p. 1220. doi: 10.1001/jama.1991.03470090054029
26. Haas E.J., Wendt V.E. Atypical measles 14 years after immunization. *JAMA*, 1976, vol. 236, no. 9, p. 1050. doi: 10.1001/jama.1976.03270100050031
27. Kaplan L.J., Daum R.S., Smaron M. Severe measles in immunocompromised patients. *JAMA*, 1992, vol. 267, no. 9, pp. 1237–1241. doi: 10.1001/jama.1992.03480090085032
28. Markowitz L.E., Chandler F.W., Roldan E.O. Fatal measles pneumonia without rash in a child with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 1988, vol. 158, no. 2, pp. 480–483. doi: 10.1093/infdis/158.2.480
29. Measles immunization in HIV-infected children. *Pediatrics*, 1999, vol. 103, no. 5, pp. 1057–1060. doi: 10.1542/peds.103.5.1057
30. Nadel S., McGann K., Hodinka R.L. Measles giant cell pneumonia in a child with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1991, vol. 10, no. 7, pp. 542–544.

Авторы:

Снегова Н.Ф., д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения иммунопатологии у детей ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФБМА, Москва, Россия;

Костинов М.П., д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИВС

им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Пахомов Д.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Ильина Н.И., д.м.н., профессор, зам. директора ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФБМА, Москва, Россия.

Authors:

Snegova N.F., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Children's Immunopathology, National Research Center — Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation;

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy of Allergic Diseases, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera,

Moscow, Russian Federation; Professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Pakhomov D.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Ilina N.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, National Research Center — Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.05.2018
Отправлена на доработку 22.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 25.05.2018
Revision received 22.03.2019
Accepted 09.04.2019

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЕСТЕСТВЕННОГО ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

А.Г. Драгомерецкая¹, М.Е. Игнатьева², О.Е. Троценко¹, Т.В. Мжельская¹,
Л.В. Будацыренова², В.И. Григорьева², А.П. Романова¹

¹ ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия

² Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), г. Якутск, Россия

Резюме. Клещевой энцефалит — природно-очаговая вирусная нейроинфекция, которая широко распространена в зоне умеренного климата Евразии. Тяжесть заболевания, которое в ряде случаев приводит к инвалидизации и летальным исходам, обуславливает его высокую эпидемиологическую значимость и является причиной неослабевающего внимания к его профилактике среди населения эндемичных территорий. При этом эпидемиологические особенности проявления заболевания на различных территориях имеют существенные различия. Республика Саха (Якутия) не относится к эндемичным территориям Российской Федерации. В то же время на территории республики в последнее десятилетие отмечается рост показателей обращаемости населения по поводу присасывания иксодовых клещей. Одним из наиболее информативных критериев оценки интенсивности эпидемического процесса в очагах клещевого энцефалита является показатель иммунологической структуры населения к возбудителю. Поэтому целью настоящего исследования стала оценка состояния естественного популяционного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения Республики Саха (Якутия) в условиях роста показателей обращаемости по поводу присасывания клеща. В ходе работы были проанализированы сведения о числе нападений на людей иксодовых клещей, произошедших на территории республики в период с 2001 по 2017 гг. Проведено обследование населения г. Якутска и административных районов республики с регистрацией наибольшего количества обращений населения по поводу присасывания клещей. Обследованию подлежали постоянно проживающие на территории республики и не привитые против клещевого вирусного энцефалита жители. В ходе наблюдения отмечено расширение перечня административных территорий, где были зарегистрированы случаи нападения иксодовых клещей и рост общего количества обращений населения по поводу присасывания клеща. Показано, что наибольшее число пострадавших лиц ежегодно регистрируется в южных районах республики — Алданском, Нерюнгринском, Олекминском, Ленском, Хангаласском, в г. Якутске и его пригородах. Специфические иммуноглобулины к вирусу клещевого энцефалита были обнаружены у $5,7 \pm 0,68\%$ обследованных жителей республики, что свидетельствует о контактах населения с возбудителем. Наибольшее число ($8,9 \pm 1,85\%$) серопозитивных лиц было выявлено в Намском районе, расположенном в центральной части республики. В целом по субъекту показатели выявляемости антител среди взрослого населения ($6,9 \pm 0,95\%$) оказались статистически значимо выше таковых среди детей ($3,9 \pm 0,89\%$, $p < 0,05$). Достоверных отличий показателей выявляемости антител у городского ($5,8 \pm 1,12\%$) и сельского ($5,63 \pm 0,84\%$) населения не установлено.

Ключевые слова: клещевой вирусный энцефалит, Республика Саха (Якутия), неэндемичная территория, напряженность иммунитета, переносчики возбудителя.

Адрес для переписки:

Драгомерецкая Анна Геннадьевна
680000, Россия, г. Хабаровск, ул. Шевченко, 2,
ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии.
Тел.: 8 (4212) 46-18-62.
E-mail: poi_hniiem@bk.ru

Contacts:

Anna G. Dragomeretskaya
680000, Russian Federation, Khabarovsk, Shevchenko str., 2,
Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (4212) 46-18-62.
E-mail: poi_hniiem@bk.ru

Библиографическое описание:

Драгомерецкая А.Г., Игнатьева М.Е., Троценко О.Е., Мжельская Т.В., Будацыренова Л.В., Григорьева В.И., Романова А.П. Оценка состояния естественного популяционного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения Республики Саха (Якутия) // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 337–346. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-337-346

Citation:

Dragomeretskaya A.G., Ignatyeva M.E., Trotsenko O.E., Mzhelskaya T.V., Budatsirenova L.V., Grigoryeva V.I., Romanova A.P. Assessing natural herd immunity to tick-borne encephalitis in Republic Sakha (Yakutia) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 337–346. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-337-346

ASSESSING NATURAL HERD IMMUNITY TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS IN REPUBLIC SAKHA (YAKUTIA)

Dragomeretskaya A.G.^a, Ignatyeva M.E.^b, Trotsenko O.E.^a, Mzhelskaya T.V.^a, Budatsirenova L.V.^b, Grigoryeva V.I.^b, Romanova A.P.^a

^a FBIS Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation

^b Central Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Republic Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russian Federation

Abstract. Tick-borne encephalitis (TBE) is a natural focal viral neuroinfection vastly spread in the mid-latitude climate zone of the Eurasia. Lethal cases and disability related to TBE determine its high epidemiological significance as well as underlie undiminished attention to prevent it in endemic territories. At the same time, TBE epidemiologic features significantly differ in various geographic areas. Importantly, Republic Sakha (Yakutia) is not among TBE endemic areas in the Russian Federation. However, in the last decade an increased incidence of ixodic tick bites was registered in the Republic Sakha. A pattern of pathogen-specific population immunity is one of the most valuable criteria for assessing magnitude of epidemic process in TBE foci. Hence, our study was aimed at assessing natural herd immunity TBEV in Republic Sakha associated with elevated incidence of tick bite visits. Here, we analyzed the data regarding the rate of tick attacks in the period of 2001–2007 in Republic Sakha. Residents and individuals unvaccinated against TBEV in the city of Yakutsk as well as various administrative regions were examined to record the peak incidence of tick attacks. It was found that a range of the administrative regions recording with registered ixodic tick attacks and elevated incidence of tick bites was expanded. Moreover, the top incidence of tick bites was annually recorded in the south regions of the republic Aldanian, Neryungri, Olyekminsk, Leninsk, Khangalassky districts, city of Yakutsk and its suburbs. Furthermore, TBEV-specific immunoglobulins were detected in $5.7 \pm 0.68\%$ of the residents examined suggesting about contacts with the pathogen. In addition, the peak count of seropositive people ($8.9 \pm 1.85\%$) was identified in Namsky district located in the central part of the republic. Overall, detection rate of TBEV-specific antibodies among general adult population ($6.9 \pm 0.95\%$) was significantly higher compared to those observed in children ($3.9 \pm 0.89\%$, $p < 0.05$). no significant differences in urban ($5.8 \pm 1.12\%$) vs. rural population ($5.63 \pm 0.84\%$) was found.

Key words: tick-borne encephalitis, Republic Sakha (Yakutia), non-endemic territory, antibody levels, pathogen carriers.

Введение

В течение последнего десятилетия в Российской Федерации (РФ) ежегодно регистрировалось от 2000 до 3700 случаев клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) [17]. Эпидемиологические особенности проявления КВЭ на различных территориях ввиду наличия особых природных и социальных условий имеют существенные различия, что подчеркивает необходимость региональных исследований в отношении данной инфекции [5, 6, 16].

В состав Дальневосточного федерального округа (ДФО) входят 9 субъектов, из них 5 являются эндемичными по КВЭ: Амурская область, Еврейская автономная область (ЕАО), Приморский край, Сахалинская область и Хабаровский край. Республика Саха (Якутия) не эндемична по клещевому энцефалиту, заболеваемость КВЭ среди населения данного региона в последние десятилетия не регистрируется [12]. При этом в последние годы отмечается увеличение числа обращений населения по поводу присасывания иксодовых клещей.

Регион характеризуется многообразием природных условий, что обусловлено физико-географическим положением республики. Несмотря на обширную площадь, территория Якутии характеризуется слабой заселенностью. На характер расселения заметное воздействие

оказывают природно-климатические и экономические факторы. Одной из демографических особенностей республики является исторически сложившийся большой удельный вес сельского населения среди общего числа жителей (35,9% против 8% — среднего показателя в других северных регионах России). Наибольшей плотностью населения (1,2–2,8 человек) отличаются районы Якутии с относительно благоприятными условиями для ведения сельскохозяйственного производства: Мегино-Кангаласский, Намский, Чурапчинский, Хангаласский и Усть-Алданский, а также города Якутск и Нерюнгри с развитой промышленностью и транспортной схемой [14].

В 60-е гг. XX в. в поисках северных границ ареала вируса клещевого энцефалита сотрудниками Иркутского противочумного института был обследован Мегино-Кангаласский район республики. Вирус КЭ был выделен из клещей *Ixodes plumbeus*, собранных в гнездах береговых ласточек на местности несколько севернее 62° с.ш. В этом же районе у 15,2% местных жителей были обнаружены комплементсвязывающие, а у 11,7% — гемагглютинирующие антитела к вирусу КЭ. В Ленском районе положительный результат в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) на клещевой энцефалит был получен у 6,6% жителей и 3,3% сельскохозяйственных животных. В централь-

ной части республики были отмечены единичные находки клещей *Ixodes persulcatus* и *Haemaphysalis concinna*. Был также описан случай заболевания жителя Олекминского района, из ликвора которого был выделен штамм 209 вируса КЭ [2, 4].

В результате анализа данных обрабатываемости населения Якутии по поводу присасывания клеща за 1975–1994 гг., проведенного И.Я. Егоровым (1996), удалось обнаружить сведения о 165 случаях нападения клещей на человека в республике. В основном это были жители г. Якутска, Алданского, Олекминского и Ленского районов. Единичные случаи были зарегистрированы в Усть-Алданском, Амгинском, Жиганском, Верхневилуйском, Намском, Чурапчинском, Нерюнгринском, Томпонском, Вилуйском, Сунтарском районах. Лишь в 5,4% случаев было установлено, что пострадавшие прибыли из южных регионов Сибири и Дальнего Востока. В остальных случаях контакты с клещами произошли на территории республики, как правило, в непосредственной близости от населенных пунктов или в их черте. В одном случае в напитавшемся клеще был обнаружен антиген вируса КЭ (предположительный район присасывания — ботанический сад г. Якутска) [4].

Изучение иммунной структуры населения к вирусу КЭ позволяет установить частоту его контактов с инфицированными переносчиками, а также нередко способствует выявлению легких, субклинических, латентных форм заболеваний [8, 11]. В связи с вышеизложенным, была определена цель исследования — оценить состояние естественного популяционного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита на современном этапе в условиях роста показателей обрабатываемости населения по поводу присасывания клеща на территории Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы

Анализ обрабатываемости населения по поводу присасывания клещей. В работе были проанализированы сведения о числе нападений на людей иксодовых клещей, произошедших на территории республики в период с 2001 по 2017 гг.

Исследование инфицированности иксодовых клещей. На базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)» методом иммуноферментного анализа на наличие антигена вируса клещевого энцефалита было исследовано 1325 иксодовых клещей, удаленных после присасывания к человеку на территории республики в 2009–2017 гг. Исследования проводили с использованием диагностических наборов «ВКЭ-антиген» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) согласно инструкции производителя.

Серологическое обследование населения. В 2015–2017 гг. обследование населения было проведено на административных территориях южной и центральной части Республики Саха (Якутия), расположенных в ландшафтных зонах лиственничной тайги бореального пояса (Алданское нагорье) — г. Алдан и Алданский район, г. Нерюнгри и Нерюнгринский район (зона 1, Южная Якутия) и средней тайги (Приленское плато, Центрально-Якутская равнина) — г. Якутск, Намский, Хангаласский, Мегино-Кангаласский и Олекминский районы (зона 2, Центральная Якутия) [9]. Всего было обследовано 1179 человек, постоянно проживающих на территории республики, не привитых против клещевого вирусного энцефалита. От всех обследованных лиц было получено информированное согласие.

Исследование биологического материала (сыворотки крови) от населения выполняли в лаборатории клещевого энцефалита и других природно-очаговых инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора. Исследования проводили методом иммуноферментного анализа с целью выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита, с использованием диагностических наборов «ВекторВКЭ-IgG» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) согласно инструкции производителя.

Расчет средней геометрической величины титра антител проводили по методике, описанной в МУ 3.1.1760-03 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета против вакциноуправляемых инфекций (дифтерия, столбняк, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит)» [13].

Статистическая обработка результатов. Для обработки полученных данных с целью подтверждения их статистической достоверности применяли метод расчета стандартной ошибки выборки m для оценки доли качественного признака в генеральной совокупности. Для проведения статистической обработки двух сравниваемых показателей в группах наблюдения, выраженных в процентах, применяли критерий Стьюдента (t). Различия считали достоверными при вероятности 95% и выше ($p < 0,05$).

Результаты

Обрабатываемость населения по поводу присасывания клеща в Республике Саха (Якутия) в 2001–2017 гг. За период 2001–2017 гг. было отмечено увеличение числа обращений по поводу присасывания клещей (рис. 1).

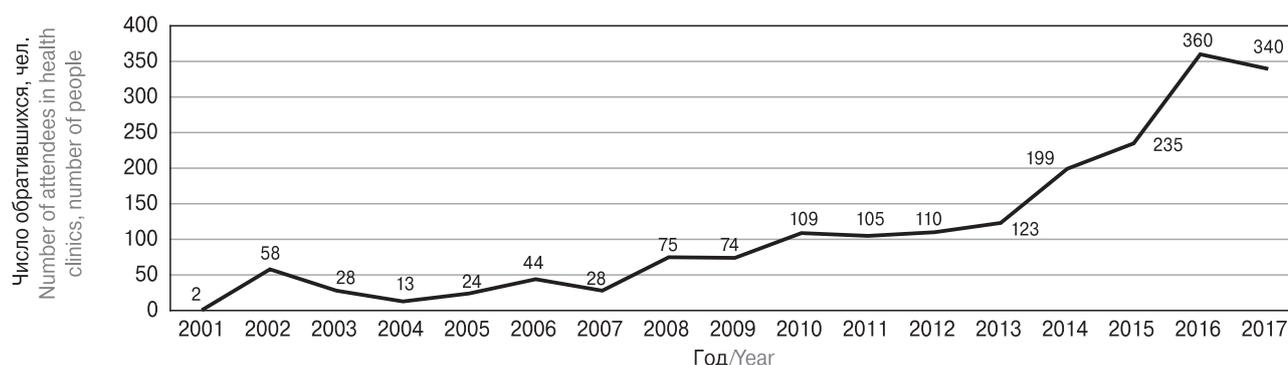


Рисунок 1. Обращаемость населения Республики Саха (Якутия) по поводу присасывания клещей в 2001–2017 гг.

Figure 1. 2001–2017 incidence of tick bite visits in Republic Sakha (Yakutia)

При этом, ввиду возможности самостоятельного удаления присосавшихся клещей населением, фактическое число лиц, пострадавших от их нападений, вероятно, несколько больше регистрируемого. За период 2011–2016 гг. произошло увеличение числа административных территорий республики, где отмечались случаи присасывания клещей — от 13 в 2011 г. до 18 в 2016 г. Наибольшее число обращений ежегодно регистрируется в южных районах республики — Алданском,

Нерюнгринском, Олекминском, Ленском, Хангаласском районах, г. Якутске и его пригородах (табл. 1, рис. 2).

Пик активности клещей приходится на июнь. Большинство случаев контакта с клещами связано с посещением лесной зоны с целью отдыха. Так, в г. Якутске ежегодно фиксируются случаи нападения клещей на людей на территории дачных районов «Сергелях», «Хатынг-Юрях», мест отдыха по Покровскому тракту, дачных участков по Вилюйскому тракту.

Таблица 1. Административные территории Республики Саха (Якутия) с регистрацией обращений по поводу присасывания клеща в 2011–2016 гг.

Table 1. 2011–2016 incidence of tick bite visits in administrative territories of Republic Sakha (Yakutia)

Наименование района Administrative territories	Годы/Years					
	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Всего по Республике Саха (Якутия) Total number in the Republic Sakha (Yakutia)	105	110	123	199	235	360
Алданский район/Aldanian district	29	19	32	54	60	102
Таттинский район/Tattinsky district	1	0	3	2	9	5
Амгинский район/Amginsky district	0	1	0	7	26	9
Вилюйский район/Vilyuysky district	0	1	1	1	1	1
Верхоянский район/Verkhoyansky district	0	0	0	0	0	1
Горный район/Gornyy district	0	1	0	0	0	2
Кобяйский район/Kobyaysky district	1	1	0	0	2	0
Нюрбинский район/Nyurbinsky district	2	4	1	3	0	5
Намский район/Namsky district	0	0	1	3	1	1
Ленский район/Lensky district	18	19	25	21	24	35
Мирнинский район/Mirninsky district	2	1	4	1	4	9
Мегино-Кангаласский район/Megino-Kangalassky district	0	0	1	10	11	1
Нерюнгринский район/Neryungrinsky district	29	18	13	38	23	64
Олекминский район/Olyekminsk district	3	16	8	20	14	45
Хангаласский район/Khangalassky district	2	5	5	12	15	6
Сунтарский район/Suntarsky district	2	10	3	8	3	28
Томпонский район/Tomponsky district	0	0	0	1	2	0
Усть-Алданский район/Ust-Aldansky district	0	0	0	2	1	0
Усть-Майский район/Ust-Maysky district	3	0	0	1	2	3
Чурапчинский район/Churapchinsky district	2	1	3	4	16	10
г. Якутск/City of Yakutsk	11	13	23	11	21	33

Важно отметить, что за период 2009–2012 гг. в клещах, удаленных после присасывания к человеку, антиген вируса КЭ не был выявлен ни в одной пробе, а в 2013 г. антиген положительными были уже $5,7 \pm 2,26\%$ клещей (табл. 2).

В 2013–2017 гг. антиген вируса КЭ был выявлен в клещах, удаленных после присасывания к человеку, в 12 районах республики (Алданский, Амгинский, Намский, Нюрбинский, Нерюнгринский, Сунтарский, Ленский, Чурапчинский, Олекминский, Мирнинский, Мегино-Кангаласский, Хангаласский) и г. Якутске.

Состояние естественного популяционного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения Республики Саха (Якутия) в 2015–2017 гг. В целом антитела к вирусу КЭ были обнаружены у $5,7 \pm 0,68\%$ обследованных жителей республики (табл. 3). Статистически значимых различий показателей выявляемости антител у населения, проживающего в зоне 1 ($5,5 \pm 0,88\%$) и в зоне 2 ($5,9 \pm 1,04\%$), не установлено.

При ранжировании серопозитивных лиц по административным образованиям республики, охваченным данным наблюдением, наибольший показатель выявляемости антител

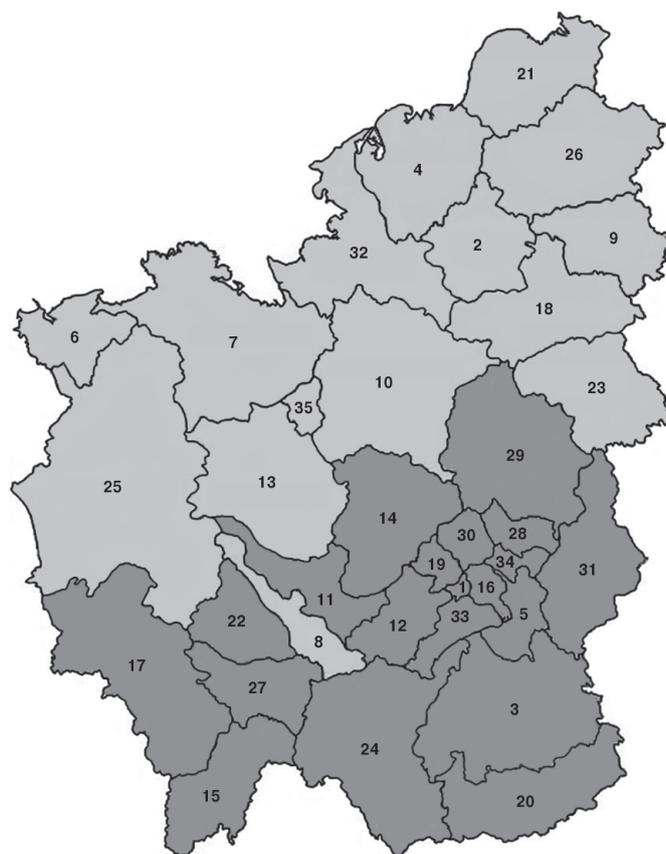
к вирусу КЭ ($8,9 \pm 1,85\%$) был отмечен в Намском районе (зона 2).

Следует отметить, что при территориальном распределении показателей были исключены Хангаласский и Мегино-Кангаласский районы ввиду малого числа обследованных лиц.

Не было выявлено достоверных различий в доле обследованных лиц — жителей зон 1 и 2, имеющих титр антител 1:100 — $2,6 \pm 0,63\%$ и $4,5 \pm 0,88\%$ соответственно. При этом, показатель выявляемости антител в титре 1:400 и выше в зоне 1 ($2,4 \pm 0,61\%$) был достоверно больше такового в зоне 2 ($0,7 \pm 0,35\%$) ($p < 0,05$).

В целом по республике показатели выявляемости антител среди взрослого населения ($6,9 \pm 0,95\%$) оказались статистически значимо выше таковых среди детей ($3,9 \pm 0,89\%$) ($p < 0,05$). Достоверных отличий показателей выявляемости антител у городского ($5,8 \pm 1,12\%$) и сельского ($5,63 \pm 0,84\%$) населения не установлено.

У большинства ($61,2 \pm 6,96\%$) серопозитивных (или $4,2 \pm 0,75\%$ обследованных) взрослых жителей республики антитела класса G к вирусу КЭ были выявлены в титре 1:100. Титры антител 1:400 и выше были определены у $26,5 \pm 6,30\%$ серопо-



- 1 – г. Якутск/Yakutsk city
- 2 – Абыйский район/Abyysky district
- 3 – Алданский район/Aldansky district
- 4 – Аллаиховский район/Allaikhovsky district
- 5 – Амгинский район/Amginsky district
- 6 – Анабарский район/Anabarsky district
- 7 – Булунский район/Bulunsky district
- 8 – Верхневилуйский район/Verkhnevilyuisky rayon
- 9 – Верхнеколымский район/Verkhnekolymsky district
- 10 – Верхоянский район/Verkhoyansky district
- 11 – Вилюйский район/Vilyuysky district
- 12 – Горный район/Gornyy district
- 13 – Жиганский район/Zhigansky district
- 14 – Кобяйский район/Kobyaysky district
- 15 – Ленский район/Lensky district
- 16 – Мегино-Кангаласский район/Megino-Kangalassky district
- 17 – Мирнинский район/Mirninsky district
- 18 – Момский район/Momsky district
- 19 – Намский район/Namsky district
- 20 – Нерюнгринский район/Neryungrynsky district
- 21 – Нижнеколымский район/Nizhnekolymsky district
- 22 – Нюрбинский район/Nyurbinsky district
- 23 – Оймяконский район/Oymyakonsky district
- 24 – Олекминский район/Olyokminsky district
- 25 – Оленекский район/Olenyoksky district
- 26 – Среднеколымский район/Srednekolymsky district
- 27 – Сунтарский район/Suntarsky district
- 28 – Таттинский район/Tattinsky district
- 29 – Томпонский район/Tomponsky district
- 30 – Усть-Алданский район/Ust-Aldansky district
- 31 – Усть-Майский район/Ust-Maysky district
- 32 – Усть-Янский район/Ust-Yansky district
- 33 – Хангаласский район/Khangalassky district
- 34 – Чурапчинский район/Churapchinsky district
- 35 – Эвено-Бытантайский район/Eveno-Bytantaysky district

Рисунок 2. Административные территории Республики Саха (Якутия), где были зарегистрированы обращения по поводу присасывания клещей в 2011–2016 гг. (выделены темно-серым цветом)

Figure 2. 2011–2016 incidence of tick bite visits in administrative territories of Republic Sakha (Yakutia) (highlighted in dark grey)

Таблица 2. Частота обнаружения антигена вируса клещевого энцефалита в клещах, удаленных после присасывания к человеку на территории Республики Саха (Якутия) в 2009–2017 гг.

Table 2. 2009–2017 prevalence of tick-borne encephalitis virus antigen in ticks detached after bite in Republic Sakha (Yakutia)

Год Year	Исследовано клещей Number of ticks examined	Обнаружен антиген ВКЭ Tick-borne encephalitis virus antigen detected	
		абс. abs.	P±pm%
2009	42	0	–
2010	60	0	–
2011	83	0	–
2012	104	0	–
2013	105	6	5,7±2,26
2014	183	19	10,4±2,26
2015	215	8	3,7±1,29
2016	265	27	10,2±1,86
2017	268	7	2,6±0,97
Всего Total	1325	67	5,1±0,60

зитивных (или у 1,8±0,50% обследованных) лиц. Максимальный показатель средней геометрической величины титра антител (СГТА) у взрослых (662,5log₂) был отмечен в Алданском районе, где у 75,0±16,37% серопозитивных лиц титр антител к вирусу КЭ составил 1:800 (табл. 4). Важно отметить, что у одного из обследованных жителей Намского района был выявлен самый высокий в данном исследовании титр антител 1:1600, что может быть обусловлено неоднократными контактами этого человека с инфицированными клещами и, возможно, перенесенной, но не диагностированной инаппарантной формой инфекции.

Среди детского населения республики титры антител 1:100 были выявлены у 64,7±11,95% серопозитивных (или 2,4±0,71% обследованных), что практически сопоставимо со взрослым контингентом обследованных. Показатели выявляемости антител в титре 1:400 и выше у детского населения республики статистически не отличались от таковых у взрослых и составили 33,3±11,11% у серопозитивных детей (или у 1,3±0,52% обследованных детей). В целом у детей республики, охваченных данным наблюдением, СГТА составила 316,7log₂, несколько превысив аналогичный показатель у взрослых (298,0log₂).

Таблица 3. Показатели выявляемости иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита у населения Республики Саха (Якутия) в 2015–2017 гг.

Table 3. Tick-borne encephalitis virus immunoglobulin G titers in the population of Republic Sakha (Yakutia) in 2015–2017

Населенный пункт Residential area	Обследовано Examined			Число серопозитивных лиц Number of seropositive samples					
	Всего Total	Взрослые Adults	Дети Children	Всего Total		Взрослые Adults		Дети Children	
				абс. abs.	P±pm, %	абс. abs.	P±pm, %	абс. abs.	P±pm, %
г. Якутск Yakutsk city	40	40	0	1	2,5±2,47	1	2,5±2,47	0	–
г. Нерюнгри Neryungri city	254	167	87	16	6,3±1,52	13	7,8±2,08	3	3,4±1,94
Нерюнгринский район Neryungri district	60	30	30	2	3,3±2,31	1	3,3±3,26	1	3,3±3,26
г. Алдан Aldan city	139	83	56	8	5,8±1,98	6	7,2±2,84	2	3,6±2,49
Алданский район Aldanian district	174	114	60	10	5,7±1,76	8	7,0±2,39	2	3,3±2,31
Намский район Namsky district	237	121	116	21	8,9±1,85	11	9,1±2,61	10	8,6±2,60
Олекминский район Olyekminsk district	235	118	117	6	2,6±1,04	6	5,1±2,03	0	–
Хангаласский район Khangalassky district	20	20	0	1	5,0±5,00	1	5,0±5,00	0	–
Мегино-Кангаласский район Megino-Kangalassky district	20	20	0	2	10,0±6,88	2	10,0±6,88	0	–
Всего Total	1179	713	466	67	5,7±0,68	49	6,9±0,95	18	3,9±0,89

Таблица 4. Показатели концентрации иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита у взрослого населения Республики Саха (Якутия) в 2015–2017 гг.

Table 4. Tick-borne encephalitis virus specific immunoglobulin G titers in adult population of the Republic Sakha (Yakutia) in 2015–2017

Населенный пункт, район Locality, district	Обследовано Subjects examined	Число серопозитивных Number of seropositive samples		Титр антител Antibody titers												СГТА** GMAT**
		абс.* abs.*	%	1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600				
				абс. abs.	P±рm, %	абс. abs.	P±рm, %	абс. abs.	P±рm, %	абс. abs.	P±рm, %	абс. abs.	P±рm, %			
г. Якутск City of Yakutsk	40	1	2,5±2,47	1	100,0	0	–	0	–	0	–	40	1	2,5±2,47	1	100,0
г. Нерюнгри Neryungri city	167	13	7,8±2,08	7	53,8±14,39	3	23,1±12,17	0	–	167	13	7,8±2,08	7	7,8±2,08	7	53,8±14,39
Нерюнгринский район Neryungri district	30	1	3,3±3,26	1	100,0	0	–	0	–	30	1	3,3±3,26	1	3,3±3,26	1	100,0
г. Алдан City of Aldan	83	6	7,2±2,84	4	66,7±21,08	1	16,7±16,68	0	–	83	6	7,2±2,84	4	7,2±2,84	4	66,7±21,08
Алданский район Aldanian district	114	8	7,0±2,39	1	12,5±12,50	0	–	1	12,5±12,50	114	8	7,0±2,39	1	7,0±2,39	1	12,5±12,50
Намский район Namsky district	121	11	9,1±2,61	9	81,8±12,20	0	–	1	9,1±9,09	121	11	9,1±2,61	9	9,1±2,61	9	81,8±12,20
Олекминский район Olyokminsk district	118	6	5,1±2,03	4	66,7±21,08	2	33,3±21,08	0	–	118	6	5,1±2,03	4	5,1±2,03	4	66,7±21,08
Хангаласский район Khangalassky district	20	1	5,0±5,00	1	100,0	0	–	0	–	20	1	5,0±5,00	1	5,0±5,00	1	100,0
Мегино-Кангаласский район Megino-Kangalassky district	20	2	10,0±6,88	2	100,0	0	–	0	–	20	2	10,0±6,88	2	10,0±6,88	2	100,0
Всего Total	713	49	6,9±0,95	30	61,2±6,96	6	12,2±4,68	2	10,7±2,80	10	22,1±3,76	1	2,0±2,00	1	2,0±2,00	298,0

Примечание: *абс. — абсолютное число; **СГТА — средняя геометрическая величина титра антител.
Note: *abs. — absolute number; **GMAT — geometric mean of antibody titers.

Обсуждение

Природно-климатические условия Якутии во многих отношениях характеризуются как экстремальные. Более 90% территории республики не затронуто или слабо затронуто промышленным освоением. Почти 80% площади территории Якутии занимает зона таежных лесов [14]. При этом в последнее десятилетие ежегодно наблюдается увеличение числа обращений населения по поводу присасывания иксодовых клещей и регистрация обращений на административных территориях, где ранее таковые не отмечались. Ежегодно сотрудниками Управления Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия) в целях профилактики клещевого вирусного энцефалита проводится санитарно-просветительская работа среди населения (публикация статей в местных изданиях, распространение памяток, выступления в средствах массовой информации). Вероятно, данное обстоятельство в некоторой степени оказывает влияние на показатели обращаемости населения по поводу исследования клещей, удаленных после присасывания. Однако мы считаем, что доминирующими факторами в данном случае являются расширение ареала иксодовых клещей и хозяйственное освоение новых территорий южных и центральных районов республики. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что ранее на территории республики регистрировали лишь единичные находки иксодовых клещей [2, 4, 7], а также данные исследователей о расширении ареала переносчиков на территории России [1, 3]. Так, в 60-е гг. XX в. Н.Д. Емельяновой в окрестностях г. Якутска были отмечены лишь отдельные находки иксодовых клещей [цит. по 7], в настоящее время здесь ежегодно регистрируется от 11 до 33 обращений по поводу присасывания клеща. Очевидно, что в данном случае увеличение частоты контактов населения с переносчиками обусловлено повышением показателей их обилия на данной территории.

Одним из критериев оценки интенсивности эпидемического процесса в очагах КВЭ является показатель иммунологической структуры населения к вирусу КЭ как наиболее информативный и объективный [11, 13, 19].

В результате настоящих исследований у населения всех охваченных обследованием районов Республики Саха (Якутия) были выявлены антитела к вирусу КЭ, что свидетельствует о контакте населения с возбудителем. Вероятной причиной наличия иммунной прослойки при отсутствии регистрируемой заболеваемости может быть циркуляция возбудителя со сниженной вирулентностью, не только не вызывающего заболевания, но и не обеспе-

чивающего выработку выраженного иммунитета [13]. Подтверждение данной гипотезы станет продолжением настоящего исследования.

Выявленные в последние годы отличия в показателях иммунитета у жителей различных административных территорий республики, очевидно, связаны с различной частотой контактов населения с иксодовыми клещами, обусловленной показателями их обилия на определенной территории, а также степенью ее хозяйственного освоения и уровнем инфицированности переносчиков вирусом КЭ.

Следует отметить, что несмотря на то, что Олекминский район является одной из административных территорий с регистрацией наибольшего в республике числа обращений по поводу присасывания клещей (табл. 1), антитела к вирусу КЭ были обнаружены только у 6 из 235 ($2,6 \pm 1,04\%$) обследованных жителей данного района (табл. 5). Вероятной причиной столь незначительной прослойки иммунных лиц может быть более низкий, по сравнению с другими территориями республики, уровень инфицированности иксодовых клещей. При этом в Намском районе, где за последние пять лет было зарегистрировано только 6 обращений, выявлено наибольшее число серопозитивных лиц. Известно, что циркуляция вируса КЭ возможна и при участии других членистоногих (гамазовых клещей, комаров) [17], поэтому сложившаяся ситуация требует детального изучения.

Важно отметить, что латентная иммунизация малыми дозами вируса, вследствие присасывания инфицированных клещей, не гарантирует защиту от заболевания и титр антител при отсутствии повторных контактов постепенно снижается. Поэтому показатели коллективного иммунитета среди непривитого населения свидетельствуют не столько о степени его «защищенности», сколько об интенсивности циркуляции возбудителя и вероятности заражения населения в данном природном очаге [8]. По данным настоящего исследования, случаи инфицирования населения вирусом КЭ отмечены на всех охваченных наблюдением территориях. При этом наиболее интенсивная циркуляция возбудителя, вероятно, происходит в природных очагах КВЭ в Намском и Алданском районах, где был выявлен не только высокий уровень серопозитивности непривитого населения, но и наибольшие показатели концентрации антител.

В соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.3.2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита» в редакции Изменений № 1, утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 20.12.2013 г. № 69, разработаны критерии определения эндемичности территории по КВЭ (пункт 2.3.3. СП)

[15]. В Республике Саха (Якутия) регистрируются случаи нападения иксодовых клещей, в которых обнаруживается антиген вируса КЭ. Настоящими исследованиями показано наличие иммунной прослойки среди непривитого населения. Однако для прогнозирования развития ситуации по КВЭ на территории республики и определения степени ее эндемичности необходимо изучение обилия и уровня инфицированности иксодовых клещей, выявление резервуаров вируса КЭ в природных очагах, изучение напряженности иммунитета к возбудителю у сельскохозяйственных животных и продолжение исследований иммунологической структуры населения.

Выводы

Несмотря на отсутствие регистрируемой заболеваемости КВЭ в Республике Саха (Якутия), выявление серопозитивных лиц с титрами антител от 1:100 до 1:1600 к вирусу КЭ среди не привитых вакциной ее жителей позволяет предположить наличие очагов КВЭ на данной территории. Ежегодное увеличение числа лиц, отмечавших присасывание клеща, выявление переносчиков, инфицированных возбудителем, дальнейшее хозяйственное освоение южных и центральных районов республики могут стать причиной перехода данного субъекта в разряд эндемичных по КВЭ территорий Российской Федерации.

Список литературы/References

1. Алексеев А.Н. Влияние глобального изменения климата на кровососущих эктопаразитов и передаваемых ими возбудителей болезней // Вестник РАМН. 2006. № 3. С. 21–25. [Alekseev A.N. Influence of global climate change on blood-sucking ectoparasites and pathogens transmitted by them. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2006, no. 3, pp. 21–25. (In Russ.)]
2. Андаев Е.И., Трухина А.Г., Борисова Т.И. Изучение клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций в Иркутском противочумном институте // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2007. № 3 (55). С. 74–78. [Andaev E.I., Trukhina A.G., Borisova T.I. Tick-borne encephalitis and other arboviral infections investigation in Irkutsk antiplague research institute. *Byulleten' VSNTS SO RAMN = Bulletin of ESCC SB RAMS*, 2007, no. 3 (55), pp. 74–78. (In Russ.)]
3. Дубинина Е.В. Глобальное потепление климата, изменение ареалов переносчиков, появление видов-вселенцев и переносимых ими возбудителей болезней // Пест-Менеджмент. 2017. № 2 (102). С. 14–24. [Dubinina E.V. Global warming, change in vector ranges, the emergence of invasive species and the pathogens transferred by them. *Pest-Menedzhment = Pest Management*, 2017, no. 2 (102), pp. 14–24. (In Russ.)]
4. Егоров И.Я., Очиров Ю.Д., Вершинин Е.А., Андросов И.А., Мирончук Ю.В. Контакты населения Республики Саха (Якутия) с клещом *Ixodes persulcatus* Sch., 1990 // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1996. № 2. С. 37–40. [Egorov I.Ya., Ochirov Yu.D., Vershinin E.A., Androsov I.A., Mironchuk Yu.V. Contacts of the population of the Republic of Sakha (Yakutia) with tick *Ixodes persulcatus* Sch., 1990. *Medicinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 1996, no. 2, pp. 37–40. (In Russ.)]
5. Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики // Terra Medica Nova. 2010. № 2. С. 13–21. [Zlobin V.I. Tick-borne encephalitis in the Russian Federation: etiology, epidemiology and preventive strategy. *Terra Medica Nova*, 2010, no. 2, pp. 13–21. (In Russ.)]
6. Коренберг Э.И. Пути совершенствования эпидемиологического надзора за природноочаговыми инфекциями // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. № 6. С. 18–28. [Korenberg E.I. Ways of epidemiological surveillance of natural focal infections improvement. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, no. 6, pp. 18–28. (In Russ.)]
7. Коренберг Э.И., Жуков В.И., Шаткаускас А.В., Бушуева Л.К. Распространение таежного клеща (*Ixodes persulcatus*) в СССР // Зоологический журнал. 1969. Т. 48, вып. 7. С. 1003–1014. [Korenberg E.I., Zhukov V.I., Shatkauskas A.V., Bushueva L.K. Distribution of taiga tick (*Ixodes persulcatus*) in the USSR. *Zoologicheskij zhurnal = Zoological Journal*, 1969, vol. 48, iss. 7, pp. 1003–1014 (In Russ.)]
8. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М., 2013. 463 с. [Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. Infections with natural focalities transmitted by ixodid ticks. *Moscow*, 2013. 463 p. (In Russ.)]
9. Медико-географический атлас России «Природноочаговые болезни» / под ред. С.М. Малхазиной. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Географический факультет МГУ, 2017. 216 с. [Medico-geographical atlas of Russia “Natural focal diseases”] *Moscow: Faculty of Geography, Lomonosov Moscow State University*, 2017. 216 p. (In Russ.)]
10. Нафеев А.А. Изучение очагов клещевого энцефалита в Среднем Поволжье с целью оптимизации профилактики // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011. № 5. С. 30–32. [Nafeev A.A. Study of foci of tick-borne encephalitis in the Middle Volga region in order to optimize prevention. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2011, no. 5, pp. 30–32. (In Russ.)]
11. Нафеев А.А., Савельева Н.В., Сibaева Э.И. Иммунологический (серологический) мониторинг в системе эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016. № 21 (5). С. 286–289. [Nafeev A.A., Savelyeva N.V., Sibaeva E.I. Immunological (serological) monitoring in the epidemiological surveillance system of natural focal infections. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2016, no. 21 (5), pp. 286–289. (In Russ.)]
12. О перечне эндемичных территорий по клещевому вирусному энцефалиту в 2017 году: Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 31 января 2018 года № 01/1205-2018-32. [On the list of the tick-borne encephalitis virus endemic constituent territories in 2016: Letter of the Federal Service on Consumer Rights and Human Wellbeing dated January 31, 2018, no. 01/1205-2018-32]

13. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета против вакциноуправляемых инфекций (дифтерия, столбняк, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит): Методические указания МУ 3.1.1760-03; утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 05.10.2003 г. [Organization and conduct of serological monitoring of the state of collective immunity against vaccine-preventable infections (diphtheria, tetanus, measles, rubella, mumps, poliomyelitis): Methodological guidelines MU 3.1.1760-03; approved by Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on 05.10.2003]
14. Официальный информационный портал Республики Саха (Якутия). [Official portal of the Government of the Republic of Sakha (Yakutia)]. URL: <https://www.sakha.gov.ru> (05.08.2017)
15. Профилактика клещевого вирусного энцефалита: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3.2352-08 в редакции Изменения № 1, утв. Постановл. Главного государственного санитарного врача РФ 20.12.2013. [Prophylaxis of the tick borne encephalitis: sanitary-epidemiological rules Sanitary Rules and Regulations 3.1.3.2352-08, № 1 amended and revised as approved by the decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated 20.12.2013]
16. Рудакова С.А., Коломеец А.Н., Пенъевская Н.А., Рудаков Н.В. Пространственная и временная структура природных очагов основных инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 6. С. 37–40. [Rudakova S.A., Kolomeets A.N., Penjevskaja N.A., Rudakov N.V. Territorial and temporal of main tick-borne infections in natural foci in Russia. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2010, no. 6, pp. 37–40. (In Russ.)]
17. Степанова Т.Ф., Брагина Е.А., Катин А.А., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В., Леонтьева С.А., Шуман В.А. О возможности существования природных очагов клещевых инфекций за пределами северных границ обитания таежных клещей // Здоровье населения и среда обитания. 2017. № 10 (295). С. 50–55. [Stepanova T.F., Bragina E.A., Katin A.A., Nechepurenko L.A., Kharkov V.V., Leontyeva S.A., Shuman V.A. About possibility of tick-borne infections natural formation outside northern borders of taiga tick habitat. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Public Health and Habitat*, 2017, no. 10 (295), pp. 50–55 (In Russ.)].
18. Шестопалов Н.В., Шашина Н.И., Германт О.М., Олехнович Е.И., Пакскина Н.Д., Морозова Н.С., Царенко В.А., Осипова Н.З., Веригина Е.В., Бойко Л.С. Заболеваемость природно-очаговыми клещевыми инфекциями в Российской Федерации и неспецифическая профилактика клещевого вирусного энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов, крымской геморрагической лихорадки и других инфекций, возбудителей которых передают иксодовые клещи (по состоянию на 01.01.2016 г.) // Дезинфекционное дело, 2016. № 1. С. 57–62. [Shestopalov N.V., Shashina N.I., Germant O.M., Olekhovich E.I., Pakskina N.D., Morozova N.S., Tsarenko V.A., Osipova N.Z., Verigina E.V., Boyko L.S. Feral and heard incidence in Russian Federation and nonspecific prophylaxis of tick-borne encephalitis, ixodic tick-borne borreliosis, Crimean-Congo hemorrhagic fever and other ixodic tick-borne infections (as of 01.01.2016). *Dezinfektsionnoe delo = Disinfection Affairs*, 2016, no. 1, pp. 57–62. (In Russ.)]
19. Ястребов В.К., Хазова Т.Г. Оптимизация системы эпидемиологического надзора и профилактики клещевого вирусного энцефалита // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 1 (162). С. 19–24. [Yastrebov V.K., Khazova T.G. The optimization of the system of epidemiological surveillance and prophylactic of the tick-borne viral encephalitis. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2012, no. 1 (162), pp. 19–24. (In Russ.)]

Авторы:

Драгомерецкая А.Г., к.б.н., зам. директора по научной работе, руководитель отдела природно-очаговых инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Игнатъева М.Е., к.м.н., руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), г. Якутск, Россия;
Троценко О.Е., д.м.н., директор ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Мжельская Т.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клещевого энцефалита и других природно-очаговых инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Будацыренова Л.В., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), г. Якутск, Россия;
Григорьева В.И., зам. начальника отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), г. Якутск, Россия;
Романова А.П., младший научный сотрудник лаборатории клещевого энцефалита и других природно-очаговых инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия.

Authors:

Dragomeretskaya A.G., PhD (Biology), Deputy Director for Science, Head of the Department of Natural Focal Infections, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;
Ignatyeva M.E., PhD (Medicine), Head of the Central Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Republic Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russian Federation;
Trotsenko O.E., PhD, MD (Medicine), Director of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;
Mzhelskaya T.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Tick-borne Encephalitis and Other Natural Focal Infections, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;
Budatsirenova L.V., Head of the Department of Epidemiological Surveillance, Central Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Republic Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russian Federation;
Grigoryeva V.I., Deputy Head of the Department of Epidemiological Surveillance, Central Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Republic Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russian Federation;
Romanova A.P., Junior Researcher, Laboratory of Tick-borne Encephalitis and Other Natural Focal Infections, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.03.2018
 Отправлена на доработку 04.03.2019
 Принята к печати 05.04.2019

Received 05.03.2018
 Revision received 04.03.2019
 Accepted 05.04.2019

ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ И БЕЛКОВ ЭЯКУЛЯТА ПРИ РАЗНОЙ ЭХОСКОПИЧЕСКОЙ КАРТИНЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.П. Годовалов¹, Т.Ю. Даниелян², Т.И. Карпунина¹, Н.В. Вавилов¹

¹ ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия

² ООО «Медицинская студия», г. Пермь, Россия

Резюме. В настоящее время практически не встречаются исследования, расшифровывающие механизмы возможного влияния условно-патогенных микроорганизмов на морфологические изменения предстательной железы. Многие авторы сомневаются в том, что бактерии являются причиной хронического простатита. В клинической практике при заболеваниях предстательной железы предпочтение отдается ультразвуковому исследованию как надежному и не требующему значительных временных затрат диагностическому тесту. В то же время многие авторы отмечают, что для диагностики воспалительных заболеваний репродуктивных органов изучение соответствующих секретов является актуальным и перспективным научным направлением. Цель исследования — изучить качественный и количественный состав микрофлоры, ряда белков эякулята на фоне разной эхоскопической картины предстательной железы. *Материалы и методы.* В исследование включили 18 мужчин, состоящих в бесплодном браке более 3 лет с установленным ранее диагнозом «хронический простатит» (N41.1; группа наблюдения), и 28 практически здоровых добровольцев (группа сравнения). Всем участникам исследования проведено трансректальное УЗИ. В эякуляте определяли концентрации иммуноглобулинов основных классов, общего белка и альбумина, а также уровень окислительной модификации белков. Микробиологическое исследование эякулята выполнено по общепринятым методикам. Для статистической оценки полученных данных использовали непарный вариант t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. *Результаты.* Микрофлора эякулята мужчин группы наблюдения представлена преимущественно грамположительными кокками. В 39% случаев установлен рост грамотрицательной микрофлоры, 71% которой был представлен *Escherichia coli*. В большинстве образцов микроорганизмы находились в составе ассоциаций, что более характерно для диффузных изменений ткани простаты. В случаях с фиброзом регистрировали заметное сужение видового спектра: из грамотрицательных бактерий изолировали только *E. coli*, а грамположительные микроорганизмы отсутствовали вовсе. Показано, что развитие фиброза в ткани предстательной железы сопровождается увеличением концентрации общего белка и альбумина в эякуляте. При переходе процесса в стадию кальцинации уровни данных показателей снижаются. Установлено, что во всех случаях, за исключением выраженного фиброза, увеличивается концентрация IgG и снижается — IgA. Развитие фиброза сопровождается снижением уровня IgG. В настоящем исследовании при определении уровня окислительной модификации белков было установлено снижение концентрации таких молекул у пациентов группы наблюдения. *Обсуждение.* В целом хронический воспалительный процесс в ткани предстательной железы мужчин репродуктивного возраста более чем в 60% случаев характеризуется фиброзированием и/или формированием кальцинатов. В такой ситуации создаются условия для персистенции условно-патогенной микрофлоры в фиброзно-измененной

Адрес для переписки:

Годовалов Анатолий Петрович
614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, 85,
ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский
университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ.
Тел.: 8 (342) 236-44-85, 8 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodvalov@gmail.com

Contacts:

Anatoliy P. Godvalov
614990, Russian Federation, Perm, Ekaterininskaya str., 85,
Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner.
Phone: +7 (342) 236-44-85, +7 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodvalov@gmail.com

Библиографическое описание:

Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И., Вавилов Н.В. Опыт изучения микрофлоры и белков эякулята при разной эхоскопической картине предстательной железы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 347–353. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-347-353

Citation:

Godvalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I., Vavilov N.V. Investigation of ejaculate microflora and protein composition in various prostate ultrasound patterns // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 347–353. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-347-353

ткани вне досягаемости факторов иммунной системы. Кроме этого, наблюдаются явления вторичного иммунодефицита на местном уровне, проявляющиеся в снижении численности лейкоцитов и их радикал-продуцирующей функции. Именно поэтому считаем обнаружение условно-патогенных микроорганизмов существенным фактом патогенеза простатита, особенно при фиброзировании и образовании кальцинатов. Таким образом, качественное и количественное изучение микрофлоры, присутствия и степени модификации основных белковых компонентов эякулята, в той или иной степени реагирующих на инфекционное воспаление, в первую очередь малосимптомное, расширяет представления о патогенезе хронического простатита и позволяет уточнить продолжительность воспалительного процесса, а также в значительной степени расшифровать эхографические изменения, регистрируемые на разных этапах развития заболевания.

Ключевые слова: микрофлора, белки, эякулят, предстательная железа, эхографическое исследование, воспаление.

INVESTIGATION OF EJACULATE MICROFLORA AND PROTEIN COMPOSITION IN VARIOUS PROSTATE ULTRASOUND PATTERNS

Godovalov A.P.^a, Danielyan T.Yu.^b, Karpunina T.I.^a, Vavilov N.V.^a

^a Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation

^b "Medical Studio" LLC, Perm, Russian Federation

Abstract. Currently, studies uncovering the mechanisms of potential effect of opportunistic pathogens on the morphological changes in the prostate gland are scarce. Generally, it is still doubtful whether bacteria may cause chronic prostatitis. Ultrasound examination as a reliable and time-saving diagnostic test is preferred in clinical practice while evaluating prostate diseases. At the same time, it is mainly noted relevant and promising for proper diagnostics to examine secretions collected in inflammatory diseases of the reproductive organs. The aim of the study was to investigate microflora composition qualitatively and quantitatively, as well as ejaculate proteins in patients with various prostate ultrasound patterns. *Materials and methods.* 18 males from couples infertile for more than 3 years with a previously diagnosed chronic prostatitis (N41.1, observation group) and 28 healthy volunteers (comparison group) were enrolled to the study to be examined by transrectal ultrasound. Concentration of ejaculate main class immunoglobulins, total protein and albumin as well as level of protein oxidative modification were measured. Ejaculate microbiological analysis was performed according to common methods. Statistical analysis of the study data was performed by using an unpaired Student's t-test. Significance level was set at $p < 0.05$. *Results.* It was found that ejaculate microbiology analysis in observation group mainly revealed Gram-positive cocci, in 39% cases — Gram-negative bacteria, wherein *Escherichia coli* was isolated in 71% specimens. Moreover, microbial associations were found in most cases typically observed in prostate diffuse changes. However, a narrowed microbiota range was found in prostatic fibrosis: among Gram-negative bacteria *E. coli* was solely isolated, whereas Gram-positive bacteria were not identified. It was demonstrated that developing prostatic fibrosis was accompanied with increased level of ejaculate total protein and albumin, which were decreased upon transition to prostatic calcification. Moreover, except advanced prostatic fibrosis, all other ejaculate samples contained increased IgG but decreased IgA level, respectively. In contrast, developing prostatic fibrosis was featured with decreased IgG level. Finally, the level of protein oxidative modification was decreased in observation group. *Discussion.* In general, in more than 60% of cases prostate chronic inflammation in males of reproductive age was characterized by prostatic fibrosis and/or calcifications that creates conditions for persistence of opportunistic microflora in fibrosis-transformed tissue unreachable to immune system factors. In addition, a local secondary immunodeficiency is noted, which is manifested by decreased amount of leukocytes and related ROS production. Therefore, detection of opportunistic microflora is essential fact in prostatitis pathogenesis, especially in developing prostatic fibrosis and calcifications. Thus, examining ejaculate microflora qualitatively and quantitatively, level of main protein oxidative modification apparently reflecting degree primarily of asymptomatic infectious inflammation, extends understanding about pathogenesis of chronic prostatitis. Such diagnostic assays added to prostate ultrasound may allow to evaluate duration of prostate inflammatory process and dramatically aid in unveiling ultrasound changes at various stages of development chronic prostatitis.

Key words: microflora, proteins, ejaculate, prostate, echographic examination, inflammation.

Известно, что значительная часть мужского населения репродуктивного возраста страдает хроническим простатитом. Отечественные и зарубежные авторы указывают на наличие признаков воспаления предстательной железы в разные периоды жизни у 35–50% мужчин [17]. Зачастую хронический простатит протекает без выраженных симптомов и остается незамеченным как

пациентами, так и врачами. Большинство подобных случаев сопряжено с длительной персистенцией микроорганизмов и сопровождается нарушением репродуктивной функции. До недавнего времени считалось, что лидирующим этиологическим фактором бактериального хронического простатита являются грамотрицательные палочки: *Escherichia coli* (до 80%), *Proteus*

mirabilis, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. и др. [12]. В последние годы накапливаются сведения о значительной роли грамположительных кокков (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp.) в этиологии хронического простатита, хотя среди урологов нет единого мнения относительно их участия в патогенезе структурно-функциональных изменений предстательной железы [22]. Описано присутствие анаэробов, коринебактерий в семенной жидкости при хроническом простатите [18]. Однако не все исследователи и клиницисты признают, что бактерии, большинство из которых относят к условно-патогенным, являются причиной такой патологии [16]. Ставится под сомнение причинно-следственная связь между морфофункциональными изменениями в простате и бактериоспермией. Более того, практически не встречаются исследования, расшифровывающие механизмы возможного влияния неспецифических инфекций, возбудители которых различаются по граммпринадлежности.

Своевременное выявление хронического простатита является весьма актуальной задачей, решение которой увеличивает шансы не только на успешное лечение воспалительного процесса, но и на устранение репродуктивных проблем. В клинической практике при заболеваниях предстательной железы предпочтение отдается ультразвуковому исследованию (УЗИ) как надежному и не требующему значительных временных затрат диагностическому тесту [16]. В то же время многие авторы отмечают, что для диагностики воспалительных заболеваний репродуктивных органов, изучение соответствующих секретов является актуальным и перспективным научным направлением [1, 7]. Однако его диагностический потенциал используется сегодня лишь в малой степени из-за недостатка данных о физиологической роли, которую играют различные компоненты. Как следствие, отсутствуют регламентирующие критерии для оценки изменения их уровней в контексте инфекций, в том числе неспецифических [9, 10, 11].

Цель исследования — изучить качественный и количественный состав микрофлоры, ряда белков эякулята на фоне разной эхоскопической картины предстательной железы.

Материалы и методы

В исследование включили 18 мужчин, состоящих в бесплодном браке более 3 лет с установленным ранее диагнозом хронический простатит (N41.1; группа наблюдения), и 28 практически здоровых добровольцев (группа сравнения). Критерием невключения служили перенесенные специфические инфекции.

При изучении анамнеза установлено, что двое из пациентов имели признаки фиброзирования, у четверых — выявлены кальцинаты, у 6 — установлено формирование кальцинатов на фоне развития фиброза, у остальных — диффузные изменения в ткани простаты с зонами повышенной эхогенности различной интенсивности и размеров с нечетко очерченными контурами.

Эякулят для исследований получали в соответствии с рекомендациями ВОЗ [26].

Определение концентрации иммуноглобулинов основных классов, общего белка и альбумина проводили с помощью соответствующих наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) согласно инструкциям производителя с постановкой необходимых контролей.

Микробиологическое исследование эякулята выполнено по общепринятым методикам [4].

Окисленно-модифицированные белки определяли с помощью метода Reznick et al. [21] в модификации [2].

Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и непараметрической статистики с использованием программы «Statistica 6.0». Для статистической оценки полученных данных использовали непарный вариант t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе исследования оценивали инфицированность эякулята и видовой спектр изолируемых при этом микроорганизмов. Установлено, что микрофлора эякулята мужчин группы наблюдения была представлена преимущественно грамположительными кокками. Коагулазоотрицательные стафилококки обнаружены у 55,5%, представители рода *Streptococcus* — у 39% мужчин. В 39% случаев установлен рост грамотрицательной микрофлоры, из которой в 71% проб выделены *Escherichia coli*, а в 29% — представители рода *Neisseria*. В большинстве образцов микроорганизмы находили в составе ассоциаций, что более характерно для диффузных изменений ткани простаты. В случаях с фиброзом регистрировали заметное сужение спектра выделяемой микрофлоры: из грамотрицательных бактерий изолировали только *E. coli*, а грамположительные микроорганизмы отсутствовали вовсе. В эякуляте мужчин группы сравнения рост бактериальной микрофлоры не обнаружен.

Учитывая присутствие практически во всех пробах от пациентов условно-патогенных микроорганизмов, интерес представляло изучение белкового состава эякулята с акцентом на возможное влияние неспецифической ин-

Таблица 1. Содержание белков в эякуляте

Table 1. Ejaculate protein composition

Результаты УЗИ Ultrasound results	Общий белок, г/л Total protein, g/l	Альбумин, г/л Albumin, g/l
Диффузные изменения Diffuse changes	56,5±6,3	19,3±2,5
С признаками фиброза With signs of fibrosis	87,1±12,1*	24,6±1,7*
С кальцинатами With calcinates	58,5±7,3	23,3±4,5*
С кальцинатами на фоне фиброза With calcinates associated with fibrosis	57,3±3,8	19,6±2,1
Группа сравнения Comparison group	50,7±1,8	15,2±0,9

Примечание. * $p < 0,05$ при сопоставлении с показателями группы сравнения.

Note. * $p < 0.05$ compared to parameters from comparison group.

фекции. Прежде всего, оценивали содержание альбумина, наличие и количественное соотношение иммуноглобулинов различных классов, а также степень окислительной модификации белков. Важным, на наш взгляд, было установить, существует ли связь между выявленными микробиологическими и биохимическими параметрами и результатами УЗИ. Показано, что развитие фиброза в ткани предстательной железы сопровождалось увеличением концентрации общего белка и альбумина в эякуляте. При переходе процесса в стадию кальцинации

Таблица 2. Содержание иммуноглобулинов в эякуляте

Table 2. Ejaculate immunoglobulin composition

Результаты УЗИ Ultrasound results	IgG, мг/мл IgG, mg/ml	IgM, мг/мл IgM, mg/ml	IgA, мг/мл IgA, mg/ml
Диффузные изменения Diffuse changes	13,1±0,9*	0,2±0,06	0,9±0,2*
С признаками фиброза With signs of fibrosis	7,3±3,1	0,2±0,09	1,5±0,5*
С кальцинатами With calcinates	14,8±2,3*	0,6±0,3	2,3±0,8*
С кальцинатами на фоне фиброза With calcinates associated with fibrosis	12,3±1,5	0,2±0,04	2,4±0,7*
Группа сравнения Comparison group	8,7±0,9	0,6±0,2	5,1±0,5

Примечание. * $p < 0,05$ при сопоставлении с показателями группы сравнения.

Note. * $p < 0.05$ compared to parameters from comparison group.

данные показатели снижались (табл. 1). Среди белковых компонентов существенное значение принадлежит иммуноглобулинам, которые обладают широким спектром функциональной активности. Установлено, что при всех случаях, за исключением выраженного фиброза, увеличивалась концентрация IgG и снижалась — IgA. Развитие фиброза сопровождалось снижением уровня IgG (табл. 2).

Кроме количественного содержания белков имеют значение изменения в их химической организации и структуре, которые могут быть результатом активности как иммунных клеток, так и микроорганизмов. Наиболее существенные последствия для функциональной активности белковых молекул развиваются при окислительном стрессе. Однако в нашем исследовании при определении уровня окислительной модификации белков было установлено снижение концентрации таких молекул у мужчин группы наблюдения (табл. 3).

Обсуждение

Известно, что фиброз — это aberrantная форма нормального заживления ран, для которой характерно накопление миофибробластов, отложение коллагена и увеличение жесткости ткани [14, 15]. Фиброз в органах связан с повреждением, вызванным различными факторами, включая старение [15], инфекцию [14], опухоли [25] и вторичные заболевания, что и приводит к патологическим изменениям. В простате он чаще развивается как вторичный процесс при наличии воспалительного очага. В настоящем исследовании показано, что при фиброзировании спектр выделяемой микрофлоры существенно сужается. Так, грамположительные микроорганизмы не выделены, а в образцах эякулята присутствовали только *E. coli*, что может быть обусловлено уникальной ферментативной активностью микроорганизма, позволяющей разрушать соединительнотканые элементы, в то время как для кокков характерен более локализованный процесс. В таких условиях наблюдается гиперплазия простатического эпителия, что подтверждено в экспериментальных исследованиях [13]. Кроме этого при простатическом фиброзе, развивающемся на фоне хронического бактериального воспаления, значительно увеличивается синтез коллагена *de novo* [27, 28]. Отмечена возможность депонирования коллагена в такой ситуации [20]. Воспаление, независимо от этиологии, создает в очаге тканевое микроокружение, богатое цитокинами и факторами роста, которые стимулируют клеточное деление, ангиогенез и обновление ткани [20]. Развитие фиброза в результате чрезмерного депонирования

Таблица 3. Содержание окисленных белков в эякуляте

Table 3. Level of ejaculate oxidized proteins

Результаты УЗИ Ultrasound results	Альдегидные производные Aldehyde derivatives	Кетонные производные Ketone derivatives	p между разными производными p-value between different derivatives
Диффузные изменения Diffuse changes	1,99±0,18*	0,87±0,13*	< 0,05
С признаками фиброза With signs of fibrosis	2,03±0,10*	0,85±0,01*	< 0,05
С кальцинатами With calcinates	2,24±0,18*	0,95±0,07*	< 0,05
С кальцинатами на фоне фиброза With calcinates associated with fibrosis	2,11±0,32*	0,86±0,14*	< 0,05
Группа сравнения Comparison group	5,21±0,36	2,65±0,19	< 0,05

Примечание. *p < 0,05 при сопоставлении с показателями группы сравнения.

Note. *p < 0.05 compared to parameters from comparison group.

ния коллагена традиционно рассматривается как прогрессирующее, необратимое состояние и терминальная стадия воспалительного заболевания; однако экспериментальными и клиническими исследованиями была доказана потенциальная возможность регресса фиброзного процесса при устранении причины заболевания и ферментативного воздействия на этот процесс с помощью коллагеназ, способствующих деградации коллагена.

Фиброз ткани железы является результатом не только хронического воспаления в ней, но и гипоксии, оксидативного стресса и хронической ишемии [23]. Именно гипоксия и связанная с ней избыточная активация свободнорадикального окисления выступают непосредственной причиной повреждения клеток. В ранее проведенных нами исследованиях показано, что при воспалительном процессе в ткани предстательной железы нарушается функциональная активность и морфологические характеристики сперматозоидов [3]. Более того, снижение поступления кислорода в область гипоксии способствует дальнейшему уменьшению функциональной активности антиоксидантной системы при активизации продукции радикальных кислородных форм [11, 24]. Следствием гипоксии является развитие деструктивных изменений, связанных с повреждением гистогематического барьера, что, в свою очередь, обуславливает выход белковых молекул из поврежденных клеток непосредственно в эякулят [28]. В настоящем исследовании у пациентов с эхоскопическими изменениями в ткани простаты, по-видимому, отсутствовали явления патологического окислительного стресса, поскольку окислительная модификация белков выражена слабо, что можно объяснить высокими компенсаторными возможностями антиоксидантных систем организма. С другой стороны, при наличии воспале-

ния, особенно хронического, лейкоциты могут проявлять слабую радикал-продуцирующую активность, либо присутствовать в малом количестве. Кроме этого известно, что различные токсины микроорганизмов угнетают функциональную активность лейкоцитов, в том числе радикал-продуцирующую. Нами установлено, что у таких пациентов в эякуляте преобладают альдегидные производные окисленных белков, которые являются маркерами фрагментации белков и свидетельствуют лишь об инициации свободнорадикального окисления. В такой ситуации процесс окислительного стресса не переходит в развитую стадию и носит обратимый характер [6, 8].

При наличии инфицированных конкрементов предстательной железы формируется зона фиброзоизмененной ткани по периферии конкремента, с резким обеднением или полным отсутствием кровотока в ней [5]. Более того, конкременты, образующиеся в простатических ацинусах при длительном воспалении, могут являться очагом персистенции микроорганизмов благодаря наличию экстрацеллюлярных полисахаридных оболочек и образованию так называемой микробной биопленки [19]. Известно, что развитие кальцинатов сопровождается нарушением целостности соединительнотканых элементов и может обеспечивать доступность микроорганизмов для факторов иммунной системы, что сопровождается увеличением синтеза IgG.

Если учесть, что хронический воспалительный процесс, в силу своей малосимптомности, существовал у пациентов длительное время, объяснимо накопление клеток памяти. Именно поэтому, в случае отсутствия фиброза или при кальцинировании, когда есть повреждение соединительнотканых элементов, микроорганизмы оказываются в доступности для имму-

нокомпетентных клеток, и лимфоциты памяти активно синтезируют преимущественно IgG, а концентрация IgA и IgM мала. С другой стороны, при развитии фиброза отсутствует достаточный стимул для развития адекватного иммунного ответа и синтеза иммуноглобулинов. Такая ситуация обусловлена «сокрытием» микробных мишеней под соединительнотканными структурами, формируемыми при фиброзе.

В целом хроническое воспаление в ткани простаты у мужчин репродуктивного возраста более чем в 60% случаев характеризуется фиброзированием ткани органа и/или формированием кальцинатов. В такой ситуации создаются условия для персистенции условно-патогенной микрофлоры в фиброзно-измененной ткани вне досягаемости факторов иммунной системы. Кроме этого наблюдаются явления вторичного иммунодефицита на местном уровне, проявляющиеся в снижении численности лейкоцитов и их радикал-

продуцирующей функции. Именно поэтому считаем обнаружение условно-патогенных микроорганизмов существенным фактом патогенеза простатита, особенно при фиброзировании и образовании кальцинатов.

Заключение

Таким образом, качественное и количественное изучение микрофлоры, присутствия и степени модификации основных белковых компонентов эякулята, в той или иной степени реагирующих на инфекционное воспаление, в первую очередь малосимптомное, расширяет представление о патогенезе хронического простатита. Как дополнение ультразвукового исследования, его результаты позволяют уточнить продолжительность воспалительного процесса и в значительной степени расшифровать эхографические изменения, регистрируемые на разных этапах развития заболевания.

Список литературы/References

1. Бобков Ю.А., Аль-Шукри С.Х., Горбачев А.Г., Галкина О.В., Козлов В.В., Тотолян А.А. Информативность показателей местного иммунитета при хроническом простатите // Медицинская иммунология. 2000. Т. 2, № 4. С. 401–408. [Bobkov Yu.A., Al-Shukri S., Gorbachev A.G., Galkina O.V., Kozlov V.V., Totolian A.A. Immunological parameters in chronic prostatitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, vol. 2, no. 4, pp. 401–408. (In Russ.)]
2. Вавилов Н.В., Шилов Ю.И. Модификация метода оценки окислительной модификации белков // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, Спец. вып. С. 254. [Vavilov N.V., Shilov Yu.I. Modification of the method for assessing the oxidative modification of proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, special iss., p. 254. (In Russ.)]
3. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Микробиота эякулята мужчин с бесплодием в условиях крупного промышленного города // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. 2015. № 17 (5–2). С. 338–343. [Godovalov A.P., Karpunina T.I. Microbiota of infertile men ejaculate in large industrial city. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. Sotsial'nye, gumanitarnye, mediko-biologicheskie nauki = Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Social, Humanitarian, Biomedical Sciences*, 2015, no. 17 (5–2), pp. 338–343. (In Russ.)]
4. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Опыт изучения образцов эякулята инфертильных мужчин с бессимптомной бактериоспермией // Здоровье и образование в XXI веке. 2015. Т. 17, № 11. С. 19–24. [Godovalov A.P., Karpunina T.I. Research experience of ejaculate samples from infertile men with asymptomatic bacteriospermia. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the XXI century*, 2015, vol. 17, no. 11, pp. 19–24. (In Russ.)]
5. Горпинченко И.И., Мигов В.Г. Ударно-волновая терапия больных хроническим калькулезным простатитом // Здоровье мужчины. 2012. № 4. С. 75–78. [Gorpinchenko I.I., Migov V.G. Shock wave therapy of patients with chronic calculous prostatitis. *Zdorov'e muzhchiny = Men's Health*, 2012, no. 4, pp. 75–78. (In Russ.)]
6. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Биомедицинская химия. 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26. [Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov G.E. Oxidative modification of human serum proteins. Methods for its determination. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 1995, vol. 41 (1), pp. 24–26. (In Russ.)]
7. Евдокимов В.В., Раков С.С., Липатова Н.А. Комплексное лабораторное исследование эякулята при заболеваниях мужской репродуктивной системы // Клиническая лабораторная диагностика. 1995. № 6. С. 114–116. [Evdokimov V.V., Rakov S.S., Lipatova N.A. Comprehensive laboratory study of ejaculate in diseases of the male reproductive system. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 1995, no. 6, pp. 114–116. (In Russ.)]
8. Копытова Т.В., Пантелеева Г.А., Дмитриева О.Н., Коткова Е.В. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространенными дерматозами // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 2. С. 41–44. [Kopytova T.V., Panteleeva G.A., Dmitrieva O.N., Kotkova E.V. The evaluation of oxidative modification of proteins in patients with chronic disseminated dermatosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2014, no. 2, pp. 41–44. (In Russ.)]
9. Тер-Аванесов Г.В. Андрологические аспекты бесплодного брака // Качество жизни. Медицина. 2004. № 3. С. 60. [Ter-Avanesov G.V. Andrological aspects of barren marriage. *Kachestvo zhizni. Meditsina = Quality of life. Medicine*, 2004, no. 3, p. 60. (In Russ.)]
10. Тотолян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний // Медицинская иммунология. 1999. Т. 1, № 1–2. С. 75–108. [Totolian A.A. Modern approaches to the diagnosis of immunopathological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 1999, vol. 1, no. 1–2, pp. 75–108 (In Russ.)]

11. Тюзиков И.А. Окислительный стресс как ключевой механизм старения: патофизиологические механизмы и SMART-диагностика // Вопросы диетологии. 2017. Т. 7, № 1. С. 47–54. [Tyuzikov I.A. Oxidative stress as a key mechanism of aging: pathophysiological mechanisms and SMART diagnostics. *Voprosy dietologii = Nutrition*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 47–54. (In Russ.)]
12. Choi Y.S., Kim K.S., Choi S.W., Kim S., Bae W.J., Cho H.J., Hong S.H., Kim S.W., Hwang T.K., Lee J.Y. Microbiological etiology of bacterial prostatitis in general hospital and primary care clinic in Korea. *Prostate Int.*, 2013, vol. 1, no. 3, pp. 133–138. doi: 10.12954/PI.13023
13. Elkahwaji J.E., Zhong W., Hopkins W.J., Bushman W. Chronic bacterial infection and inflammation incite reactive hyperplasia in a mouse model of chronic prostatitis. *Prostate*, 2007, vol. 67, no. 1, pp. 14–21. doi: 10.1002/pros.20445
14. Fabre V., Wu H., PondTor S., Coutinho H., Acosta L., Jiz M., Olveda R., Cheng L., White E.S., Jarilla B. Tissue inhibitor of matrix-metalloprotease1 predicts risk of hepatic fibrosis in human schistosoma japonicum infection. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 203, pp. 707–714. doi: 10.1093/infdis/jiq099
15. Karsdal M.A., Genovese F., Madsen E.A., Manon-Jensen T., Schuppan D. Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis. *J. Hepatol.*, 2016, vol. 64, pp. 103–109. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.014
16. Khan F.U., Ihsan A.U., Khan H.U., Jana R., Wazir J., Khongorzul P., Waqar M., Zhou X. Comprehensive overview of prostatitis. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, vol. 94, pp. 1064–1076. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.016
17. Krieger J.N., Lee S.W., Jeon J., Cheah P.Y., Liong M.L., Riley D.E. Epidemiology of prostatitis. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2008, vol. 31 (suppl. 1), pp. S85–S90. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.08.028
18. Nagy E., Szöke I., Török L., Pajor L. The role of anaerobic bacteria in prostatitis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000, vol. 485, pp. 289–299. doi: 10.1007/0-306-46840-9_38
19. Nickel J.C. Chronic prostatitis: current concepts and antimicrobial chemotherapy. *Infect. Urol.*, 2000, vol. 13, no. 5, pp. 22–28.
20. Palapattu G.S., Sutcliffe S., Bastian P.J. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26, no. 7, pp. 1170–1181. doi: 10.1093/carcin/bgh317
21. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzym.*, 1994, vol. 233, pp. 357–363. doi: 10.1016/S0076-6879(94)33041-7
22. Stamatiou K. The undefined role of Gram positive bacteria in chronic prostatitis development. *Infez. Med.*, 2013, vol. 21 (1), pp. 85–87.
23. Thurmond P., Yang J.-H., Li Y., Lerner L.B., Azadzi K.M. Structural modifications of the prostate in hypoxia, oxidative stress, and chronic ischemia. *Korean J. Urol.*, 2015, vol. 56, no. 3, pp. 187–196. doi: 10.4111/kju.2015.56.3.187
24. Tinkel J., Hassanain H., Khouri S.J. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. *Cardiol. Rev.*, 2012, vol. 20, no. 2, pp. 77–83. doi: 10.1097/CRD.0b013e31823dbbad
25. Trujillo K.A., Heaphy C.M., Mai M., Vargas K.M., Jones A.C., Vo P., Butler K.S., Joste N.E., Bisoffi M., Griffith J.K. Markers of fibrosis and epithelial to mesenchymal transition demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *Int. J. Cancer.*, 2011, vol. 129, pp. 1310–1321. doi: 10.1002/ijc.25788
26. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO, 2010. 271 p.
27. Wong L., Hutson P.R., Bushman W. Prostatic inflammation induces fibrosis in a mouse model of chronic bacterial infection. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 6: e100770. doi: 10.1371/journal.pone.0100770
28. Wong L., Hutson P.R., Bushman W. Resolution of chronic bacterial induced prostatic inflammation reverses established fibrosis. *Prostate*, 2015, vol. 75, no. 1, pp. 23–32. doi: 10.1002/pros.22886

Авторы:

Годовалов А.П., к.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;

Даниелян Т.Ю., д.м.н., главный врач ООО «Медицинская студия», г. Пермь, Россия;

Карпунина Т.И., д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;

Вавилов Н.В., ординатор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия.

Authors:

Godovalov A.P., PhD (Medicine), Leading Researcher of the Central Scientific Laboratory; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;

Danielyan T.Yu., PhD, MD (Medicine), Chief Medical Officer, LLC "Medical Studio", Perm, Russian Federation;

Karpunina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;

Vavilov N.V., Resident Physician, Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation.

ПРОБЛЕМА КОКЛЮША В НЕКОТОРЫХ РЕГИОНАХ МИРА

А.А. Басов¹, О.В. Цвиркун¹, А.Г. Герасимова¹, А.Х. Зекорева²

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

² ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии города Москвы в Северном округе, Москва, Россия

Резюме. Коклюшная инфекция остается актуальной проблемой как для зарубежного, так и для отечественного здравоохранения. Рост заболеваемости коклюшем в разных возрастных группах населения заставляет исследователей искать новые пути борьбы с этой инфекцией и совершенствовать методы лабораторной диагностики коклюша. Учитывая непродолжительный эффект бесклеточной и цельноклеточной вакцин, одним из обсуждаемых в литературе вопросов является целесообразность введения второй и даже третьей ревакцинации против коклюша. Цель данной работы — проанализировать опыт и эффективность применения некоторыми странами бесклеточных вакцин, в профилактическом календаре которых используются вторая и третья ревакцинация против коклюша для определения перспективы стратегии и тактики иммунизации против коклюша в России. Анализ заболеваемости коклюшем показал, что в последние годы (2008–2015 гг.) в большинстве стран европейского региона, а также в Австралии, Канаде и США, на фоне высокого охвата прививками регистрируется большое количество заболевших этой инфекцией. Причины, способствующие повышению заболеваемости коклюшем, остались до конца не выясненными. Исследователи пытаются объяснить ситуацию невысоким охватом прививками среди подростков и взрослых; ослаблением иммунной защиты после вакцинации; генетическими изменениями *Bordetella pertussis*; меньшей продолжительностью протективного иммунитета у детей, привитых бесклеточной вакциной, по сравнению детьми, привитыми цельноклеточной вакциной; повышением информативности и отчетности о заболеваниях, и, наконец, совершенствованием метода лабораторной диагностики путем перехода от серологических и бактериологических к молекулярно-генетическим методам лабораторного исследования. Пытаясь разрешить проблему, ученые ряда стран объединились для обсуждения ситуации и выработки стратегии снижения заболеваемости этой инфекцией. Для нашей страны наиболее актуально усиление и/или совершенствование существующей стратегии иммунизации младенцев с целью обеспечения высокого охвата четырьмя дозами вакцины для снижения риска заболеваемости и смертности детей от коклюша. Представляет интерес и стратегия «кокона», учитывая высокий риск инфицирования детей первых месяцев жизни. Полагаем, что России целесообразно изучить возможность использования бесклеточной вакцины в качестве первой вакцинации детей 2–3 месяца жизни, что, прогнозируемо, увеличит охват прививками этого контингента детей, а также позволит увеличить долю детей, имеющих законченную вакцинацию к 5 месяцам. При этом рациональнее будет сохранить в действующем календаре профилактических прививок количество возрастных групп, подлежащих прививкам против коклюша, так как при расширении возрастных границ вакцинации есть риск увеличения заболеваемости коклюшем среди лиц старшего возраста, диагностика которого у таких лиц достаточно проблематична.

Ключевые слова: коклюш, бесклеточные вакцины, иммунизация, ревакцинация, календарь прививок, заболеваемость.

Адрес для переписки:

Басов Артем Александрович
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.
Тел./факс: 8 (495) 459-21-46.
E-mail: a.basov_pochta@mail.ru

Contacts:

Artem A. Basov
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone/Fax: +7 (495) 459-21-46.
E-mail: a.basov_pochta@mail.ru

Библиографическое описание:

Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Зекорева А.Х. Проблема коклюша в некоторых регионах мира // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 354–362. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-354-362

Citation:

Basov A.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Zekoreeva A.Kh. The problem of pertussis in some geographic regions of the world // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 354–362. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-354-362

THE PROBLEM OF PERTUSSIS IN SOME GEOGRAPHIC REGIONS OF THE WORLD

Basov A.A.^a, Tsvirkun O.V.^a, Gerasimova A.G.^a, Zekoreeva A.Kh.^b

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

^b Center for Hygiene and Epidemiology of the Moscow in the Northern District, Moscow, Russian Federation

Abstract. Pertussis infection remains a high-priority issue both for Russian health care and abroad. A rise of pertussis incidence in various human age groups instigates a search for new ways to fight this infection and improve methods for its laboratory diagnostics. By taking into consideration a short-term effect induced by acellular and whole-cell vaccines, a feasibility of introducing the second or even the third pertussis revaccination is vigorously debated. Objective of the study was to analyze the experience and effectiveness of acellular pertussis vaccines in countries, which use the second and third pertussis revaccination in the National Immunization Schedule in order to have an insight into adjusting strategy and tactics of pertussis immunization in Russia. Analyzing pertussis prevalence demonstrated that despite a wide immunization coverage pertussis incidence in the last years (2008–2015) was increased in a large number of countries in the European region, as well as in Australia, Canada and USA. However, the reasons for elevated pertussis incidence have not been clarified yet. On one hand, it may be accounted for by low vaccination coverage in adolescents and adults; weakened immune protection after vaccination; genetic changes in *Bordetella pertussis*; shortened durability of protective immunity in children vaccinated with acellular vs. whole-cell vaccine; improved monitoring and morbidity reporting, as well as improved laboratory diagnostics due to shifting from serological and bacteriological to molecular genetic assays. In an attempt to solve this issue, researchers from several countries collaborate to discuss and develop a strategy to reduce pertussis incidence. For Russia, the most important is to empower and/or improve existing infant immunization strategy in order to provide wide coverage with the four dose pertussis vaccine for decreasing the risk of pertussis morbidity and mortality. It is worth noting the “cocoon” strategy given the high risk of pertussis infection in children of the first months of life. We believe that for Russia it is worth investigating an opportunity of using children 2–3 months of life an acellular vaccine as the first vaccination, which is expected to increase the coverage of this cohort and allow to increase proportion of children who might complete vaccination by 5 months of age. At the same time, more reasonable might be to preserve a number of age groups for pertussis vaccination in the current National Immunization Schedule, as expanding age limits for vaccination might put a risk at increasing pertussis morbidity in older individuals, which could be hard to diagnose.

Key words: pertussis, acellular vaccines, vaccines, immunization, revaccination, immunization schedule, incidence.

Введение

Коклюшная инфекция, несмотря на многолетнее использование бесклеточных и цельноклеточных вакцин и различных схем иммунизации, остается актуальной проблемой как для зарубежного, так и для отечественного здравоохранения.

Особенностью современной коклюшной инфекции является регистрация вспышек с вовлечением не только детей, но и подростков, и взрослых [2, 16, 17]. Рост заболеваемости коклюшем в разных возрастных группах населения заставляет исследователей искать новые пути борьбы с этой инфекцией и совершенствовать методы лабораторной диагностики коклюша. Учитывая непродолжительный эффект бесклеточной и цельноклеточной вакцин, одним из обсуждаемых в литературе вопросов является целесообразность введения второй и даже третьей ревакцинации против коклюша. Некоторые авторы [3, 4, 5, 6, 7] видят решение проблемы борьбы с этой инфекцией в добавлении в календарь профилактических прививок новых возрастных групп, надеясь не только на прямой, но и на косвенный эффект иммунизации — уменьшение числа источников инфекции, что позволит защитить наиболее уяз-

вимую группу населения — детей первого года жизни. Другие отмечают, что особенностью бесклеточных вакцин является невозможность полностью предупредить заражение [10, 29], и хотя заболевание проходит в легкой или бессимптомной форме, количество источников инфекции снизится незначительно.

Доводы ряда исследователей основываются на неспособности некоторых бесклеточных вакцин создавать полноценную длительную защиту против коклюша среди новорожденных и детей в возрастной группе до 5 лет [11, 19]. В результате применения таких вакцин дети нуждаются в дополнительных ревакцинирующих прививках для достижения адекватных уровней иммунитета. В то же время специалисты ВОЗ полагают, что после повторной ревакцинации бесклеточной вакциной ослабление иммунитета будет происходить быстрее [2], а английские ученые R.M. Andersen и R.M. May [1] пришли к выводу, что увеличение кратности ревакцинаций не повлияет на контроль за инфекцией. Подтверждением этому служит опыт применения в России для второй ревакцинации более иммуногенной АКДС-вакцины, что не принесло ожидаемого положительного результата. Изучить и сопоставить опыт применения некоторыми странами бесклеточных вакцин, в про-

филактическом календаре которых используется вторая и третья ревакцинация против коклюша, для определения перспективы стратегии и тактики иммунизации против коклюша в России и явилось целью данной работы.

Материалы и методы

Для анализа использовались данные о заболеваемости коклюшем Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), данные Европейского регионального бюро ВОЗ (ЕРБ ВОЗ) в информационной системе CISID, данные литературных источников, а также формы статистического наблюдения в Российской Федерации: форма № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и форма № 6 «Сведения о контингентах детей и взрослых, привитых против инфекционных заболеваний» (2008–2011 гг.). В работе использовался метод ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости коклюшем.

Результаты

В настоящее время в мире для создания противокклюшного иммунитета используются как цельноклеточные, так и бесклеточные вакцины, отличающиеся по реактогенности, типу вызываемого иммунного ответа, и обеспечивающие различный по продолжительности и напряженности поствакцинальный иммунитет. Разработке и внедрению в практику низкореактогенной бесклеточной вакцины способствовал рост заболеваемости коклюшем в начале 90-х гг. прошлого столетия, который начался вскоре после отказа некоторых стран от вакцинации цельноклеточными вакцинами [14].

Так, в 1976 г. после гибели двоих детей после вакцинации, японское правительство решило прекратить использование дающей осложнения цельноклеточной вакцины, полученной из США. Охват прививками против коклюша снизился с 80% в 1974 г. до 10% в 1976 г., в результате чего в 1979 г. началась эпидемия коклюша: было зарегистрировано более 13 000 случаев заболевания и 41 случай с летальным исходом. В этот период начались работы по созданию более безопасной бесклеточной вакцины, испытания которой прошли в 1980–1981 гг. [14, 25].

Успешная программа вакцинации против коклюша в Великобритании была прервана после выявления 36 неврологических реакций на цельноклеточные коклюшные вакцины (1980 г.) и развернувшейся в след за этим антивакцинальной кампании в прессе и на телевидении. Потеря доверия к вакцине привела к резкому сокращению охвата населения прививками: последовала эпидемия коклюша, были зарегистрированы случаи смерти среди детей. Доверие к вакцине было восстановлено после подтверждения ее эффективности на «национальном уровне», что позволило добиться целевого охвата прививками, способствовавшего резкому сокращению заболеваемости коклюшем, которая до настоящего времени остается низкой.

В Австралии, несмотря на немалое число противников цельноклеточной вакцины, заболеваемость коклюшем в 1980–1990-е гг. составляла менее 1 на 100 тыс. населения [14]. Контроль за коклюшной инфекцией осуществлялся с 70-х гг. прошлого века. Однако доверие к вакцине изменилось после информации из Великобритании о множестве неврологических реакций, предположительно связанных с вакциной, что привело к резкому снижению охвата вакцинацией против этой инфекции (до 70%) и росту заболеваемости.

Именно тогда произошли изменения в схемах иммунизации — увеличение возрастных групп, подлежащих вакцинации. В связи с этим определенный интерес представляет анализ заболеваемости коклюшем в странах с многолетним использованием бесклеточной вакцины и различных схем вакцинации против этой инфекции.

Именно тогда произошли изменения в схемах иммунизации — увеличение возрастных групп, подлежащих вакцинации. В связи с этим определенный интерес представляет анализ заболеваемости коклюшем в странах с многолетним использованием бесклеточной вакцины и различных схем вакцинации против этой инфекции.

В таблице 1 приведены календари профилактических прививок против коклюша в некоторых странах мира.

Из представленной таблицы видно, что низкая реактогенность бесклеточной вакцины позволила Канаде, США, некоторым странам Европы и Австралии применять ее детям в возрасте двух месяцев жизни, тогда как в нашей стране первая вакцинация АКДС-вакциной осуществляется в возрасте трех месяцев. Кроме того, в календарь профилактических прививок многих стран мира введены две ревакцинирующие или так называемые «бустирующие» прививки против коклюша. В некоторых странах число ревакцинаций достигает трех и более.

Тем не менее анализ заболеваемости коклюшем показал, что в последние годы (2008–2015 гг.) в большинстве стран европейского региона, Австралии, Канаде и США, на фоне высокого охвата прививками регистрируется большое количество заболевших этой инфекцией. Наибольшее число больных коклюшем зарегистрировано в США: количество заболевших колебалось от 18 719, выявленных в 2011 г., до 48 277 — в 2012 г. Большое число больных коклюшем определялось в Австралии (11 842–38 040), в Германии (9000–12 260). В Великобритании число заболевших коклюшем в 2009–2010 гг. составляло соответственно 846 и 518 человек. Рост заболеваемости начался в 2011 г., достигнув максимума в следующем в 2012 г. — 11 980 больных. В Канаде

и в Японии абсолютное число заболевших было заметно меньше: так, показатели заболеваемости в Канаде колебались от 676 случаев в 2011 г. до 4845 — в 2012 г.; в Японии минимальное число зарегистрированных больных коклюшем наблюдалось в 2013 г. — 1663 случаев, а максимальное — 5406 — в 2010 г. Следует отметить, что для диагностики случаев коклюша в большинстве стран используют современные методы лабораторной диагностики.

В России, где используется цельноклеточная АКДС-вакцина, абсолютное число зарегистрированных случаев коклюша колеблется от 4056 человек (2009 г.) до 7220 (2012 г.).

При сравнении интенсивных показателей заболеваемости коклюшем в некоторых регионах оказалось, что самый высокий показатель регистрировался в Австралии (рис.).

Так, с 2008 г. показатель заболеваемости в этой стране не опускался ниже 49 на 100 тыс. населения, в отдельные годы достигая показателя 157,6 (2011 г.). Возможно, на высоких показателях заболеваемости в этой стране сказывается использование с 2004 г. для лабораторной диагностики коклюша в основном молекулярно-генетических методов исследования. По данным исследователей [28, 30] в Австралии охват вакцинацией против коклюша в декре-

тированных возрастах в период с 2003–2016 гг. составлял в среднем 92%. Более того, с 2003 г. в стране, кроме дополнительной ревакцинации, было рекомендовано использовать стратегию «кокона», вакцинируя бесклеточной DТаР вакциной беременных женщин и родственников новорожденного ребенка, не болевших и не привитых против коклюша. Однако, несмотря на достаточно высокий процент привитого населения, заболеваемость в стране оставалась на высоком уровне. Преимущественно болели дети первых шести месяцев жизни, не подлежащие вакцинации по возрасту: в отдельные годы показатель заболеваемости был более 500 на 100 тыс. населения (2008 и 2011 гг.). Второй по высоте показатель приходился на детей в возрасте 5–14 лет (485 на 100 тыс. населения в 2011 г.). Заболеваемость подростков 15–18 лет и взрослых была самой низкой по сравнению с другими возрастными группами и даже в годы подъема не превышала показателя 100 на 100 тыс. населения.

В США исследователи справедливо называют эту инфекцию наименее контролируемой из всех бактериальных заболеваний, предотвращаемых вакцинацией. Рост заболеваемости коклюшем начался с 2004 г., когда показатель на 100 тыс. населения составил 9,0. Случаи за-

Таблица 1. Календарь профилактических прививок против коклюша в некоторых странах мира

Table 1. The National Pertussis Immunisation Schedule approved in some countries

Страна/Вакцина Country/Vaccine	Вакцинация (мес.) Age of vaccination (months)			Ревакцинация Revaccination		
	1	2	3	R1	R2	R3
БКВ Acellular vaccine						
Австралия Australia	2	4	6	16–18 мес. 16–18 months	4 года 4 years	10–15 лет 10–15 years
Германия Germany	2	3	4	11–14 мес. 11–14 months	5–6 лет 5–6 years	9–17 лет 9–17 years
Греция Greece	2	4	6	15–18 мес. 15–18 months	4–6 лет 4–6 years	11–12 лет 11–12 years
Венгрия Hungary	2	3	4	18 мес. 18 months	6 лет 6 years	11–12 лет 11–12 years
Италия Italy	3	5	11	18 мес. 18 months	6 лет 6 years	12–18 лет 12–18 years
Испания Spain	2	4	11	18 мес. 18 months	6 лет 6 years	
Португалия Portugal	2	4	6	18 мес. 18 months	5–6 лет 5–6 years	
США USA	2	4	6	15–18 мес. 15–18 months	4–6 лет 4–6 years	11–12 лет 11–12 years
Канада Canada	2	4	5	18 мес. 18 months	4–6 лет 4–6 years	14–16 лет 14–16 years
ЦКВ (АКДС) Whole cell vaccine (DTP)						
Россия Russia	3	4,5	6	18 мес. 18 months		

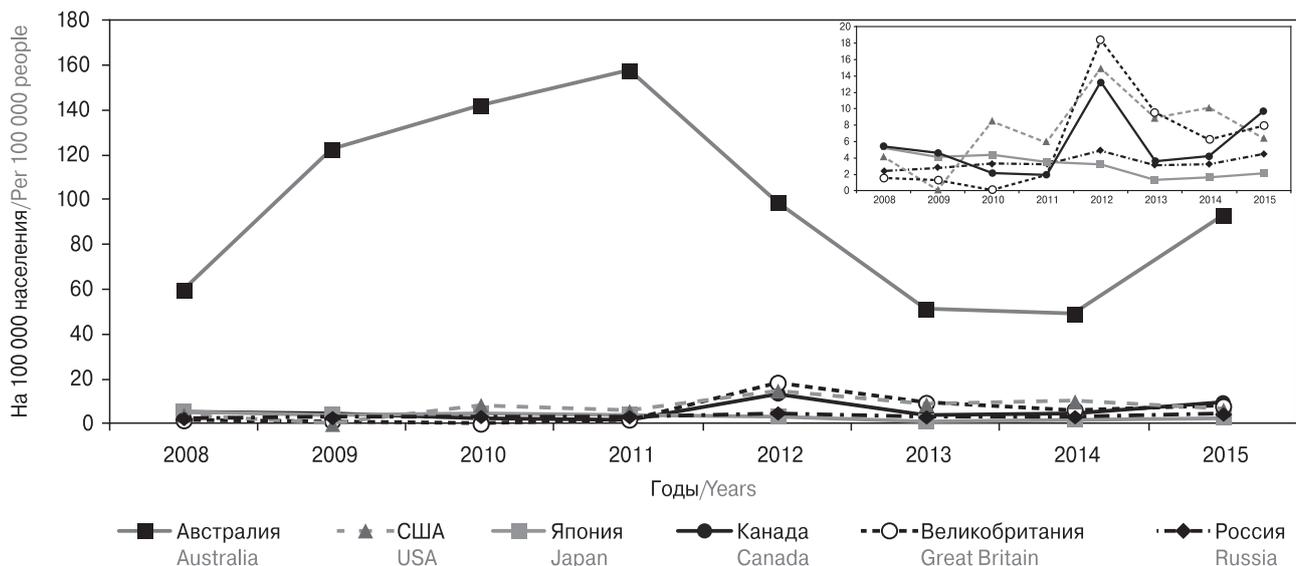


Рисунок. Заболеваемость коклюшем в некоторых странах мира, использующих дополнительные ревакцинации, и в России

Figure. The pertussis incidence recorded in some countries of the world applying additional revaccinations as well as in Russia

Примечание. В правом верхнем углу — фрагмент рисунка без отображения заболеваемости в Австралии.
Note. In the upper right corner — fragment of the figure without displaying pertussis incidence in Australia.

болевания коклюшем регистрировались в равной степени среди детей до 1 года, школьников и лиц старшего возраста [9, 26, 30]. Наиболее показательна вспышка этой инфекции в Калифорнии [31], демонстрирующая ситуацию по коклюшу в США, в 2010 г., когда абсолютное число заболевших коклюшем в стране достигло 27 550 случаев. Исследователи из Калифорнийского Департамента общественного здоровья отмечают, что число заболевших составило 9154, а наибольшее количество заболевших было среди детей младше 6 месяцев, не получившие полностью прививку в силу возраста (показатель заболеваемости составил 445,9 на 100 тыс. населения). На втором месте по высоте показателя дети 7–10 лет (107,3 на 100 тыс. населения), среди которых более 70% получили 5 доз прививки против коклюша и были полностью привиты против этой инфекции. Количество случаев коклюша начинает снижаться с возрастной группы 10 лет, достигая среди взрослых старше 19 лет показателя 7,5 на 100 тыс. населения.

Ряд исследователей отмечают, что относительно невысокая заболеваемость взрослых старше 18 лет, скорее всего, связана с преобладанием легких форм и пропущенными случаями в этой возрастной группе [2, 12]. Все 10 летальных случаев, зафиксированных в 2010 г. в Калифорнии, приходились на здоровых детей преимущественно в возрасте младше 2 месяцев, один из которых успел получить первую дозу

бесклеточной противокклюшной вакцины за 15 дней до начала заболевания.

В США в 2011 г. количество заболевших коклюшем превысило 18 000 человек, сообщалось о 9 случаях, закончившихся летальным исходом. Пик заболеваемости пришелся на 2012 г., когда в стране было зарегистрировано более 48 000 больных коклюшем.

В Великобритании подъем заболеваемости в 2011 г. был обусловлен случаями коклюша, зарегистрированными преимущественно среди подростков и взрослых старше 35 лет. Нельзя исключить, что это смещение заболеваемости является результатом применения существующей в стране схемы вакцинации. Пик заболеваемости пришелся на 2012 г., когда всего было выявлено более 11 980 заболевших. В последующие годы рост заболеваемости отмечался во всех возрастных группах, особенно среди непривитых детей первого года жизни. Сообщалось о 14 летальных случаях среди непривитых детей в возрасте до года, не успевших получить прививку против коклюша в силу возраста [8, 24, 27].

Несколько иная картина заболеваемости наблюдается в Канаде и в Японии.

В Канаде при аналогичном характере динамики заболеваемости интенсивные показатели были несколько меньше и в период с 2008 по 2015 гг. не превышали 13,4 на 100 тыс. населения в 2012 г., в среднем составляя 5,6 на 100 тыс. населения. Преимущественно болели дети в возрасте 5–9 и 10–14 лет (в среднем 15,4 и 22,7%

от всех заболевших соответственно). Однако наиболее высокий риск заболевания коклюшем сохранялся в группе детей первого года жизни (показатель заболеваемости превышал 100 на 100 тыс. населения) [18, 23].

В Японии, которая одной из первых стран мира начала использовать для профилактики коклюша бесклеточную вакцину, показатель заболеваемости колебался от 1,3 (2013 г.) до 5,3 на 100 тыс. населения (2015 г.). Как и в других странах, коклюшем заболевали преимущественно дети. Однако, начиная с 2008 г., исследователи отмечали рост числа заболевших среди подростков и взрослых старше 15 лет, что возможно связано с использованием дополнительных ревакцинирующих прививок против коклюша, а также применение для лабораторной верификации случаев коклюша не только бактериальных, серологических, но и молекулярно-генетических методов, что позволяло диагностировать заболевание в кратчайшие сроки и на разных стадиях развития инфекционного процесса [21].

Обсуждение

В большинстве стран, использующих бесклеточную коклюшную вакцину и дополнительные прививки детям старше 18 месяцев, подросткам и взрослым, подъем заболеваемости коклюшем в 2011–2012 гг. вызвал массовый общественный резонанс. Причины, способствовавшие повышению заболеваемости коклюшем, остались до конца не выясненными. Исследователи, пытаясь объяснить ситуацию, называли следующие потенциальные факторы: невысокий охват прививками, в том числе среди подростков и взрослых; ослабление иммунной защиты после вакцинации; генетические изменения *Bordetella pertussis*; меньшая продолжительность протективного иммунитета у детей, привитых бесклеточной вакциной, по сравнению детьми, привитыми цельноклеточной вакциной; повышение информативности и отчетности о заболеваниях, и, наконец, совершенствование метода лабораторной диагностики путем перехода от серологических и бактериологических к молекулярно-генетическим методам лабораторного исследования [11, 15].

Для борьбы с коклюшем, в частности в США, были созданы и распространялись образовательные материалы, клинические инструкции, а также пресс-релизы местных департаментов здравоохранения с целью предотвращения серьезных осложнений этой инфекции у детей. Изменить ситуацию предлагалось также вакцинацией взрослых в возрасте 64 лет и старше, имеющих контакт с детьми, не полностью привитых детей 7–9 лет и беременных женщин

дифтерийно-столбнячно-коклюшной вакциной с бесклеточным компонентом. Было организовано снабжение общедоступными столбнячно-дифтерийно-коклюшными вакцинами госпиталей, центров общественного здоровья, а также родильных домов для иммунизации беременных и женщин в послеродовом периоде.

Пытаясь разрешить проблему, ученые ряда стран объединились для обсуждения ситуации и выработки стратегии снижения заболеваемости этой инфекцией [11, 12, 20, 22] (табл. 2).

Представленные в таблице стратегии иммунизации уже несколько лет используются в разных странах, но в результате проведенного анализа становится очевидным, что использование бесклеточной вакцины, как и введение дополнительных прививок, не предупреждает роста заболеваемости коклюшем в европейских странах, Канаде, Японии, Австралии и США.

По-прежнему сохраняется риск заболевания коклюшем детей первого года жизни, среди которых регистрировались случаи смерти, а дополнительные ревакцинирующие прививки привели к увеличению заболеваемости коклюшем взрослых (от 3 до 15%), что еще больше осложняет проблему.

Безусловно, новая бесклеточная вакцина имеет много серьезных преимуществ по сравнению с АКДС-вакциной, и, прежде всего, ее использование существенно снижает число поствакцинальных реакций и поствакцинальных осложнений. Но, к сожалению, по сравнению с цельноклеточной вакциной она не гарантирует более продолжительного иммунитета, не предупреждает развитие тяжелых форм коклюша, на что надеялись многие исследователи. Бесклеточная вакцина содержит те же токсические добавки, что и другие вакцины, и, наконец, имеет высокую стоимость производства препарата и одной его дозы.

Заключение

Несмотря на несомненные успехи вакцинопрофилактики, использование бесклеточной вакцины против коклюша не оправдало ожиданий ее создателей и не решило проблемы этой инфекции, также как и расширение возрастных групп, подлежащих вакцинации. В большинстве стран регистрируется высокая заболеваемость и смертность детей первого года жизни, продолжают сохраняться цикличность эпидемического процесса коклюша и участие в нем детей школьного возраста.

Определяя стратегию борьбы с коклюшем в России, необходимо взвесить все «за» и «против», поскольку каждая из представленных в таблице стратегий имеет свои плюсы и минусы. Для нашей страны, где много лет существу-

Таблица 2. Стратегии снижения заболеваемости коклюшем

Table 2. Strategies for reducing pertussis incidence rate

Стратегия иммунизации Immunisation strategy	Плюсы стратегии Strategy's pros	Минусы стратегии Strategy's cons
1. Всеобщая иммунизация взрослых (18 лет и старше) 1. Universal immunization of adults (18 years of age and older)	Снизит заболеваемость коклюшем у взрослых, будет способствовать развитию коллективного иммунитета к коклюшу Reduces pertussis incidence in adults; promotes development of herd immunity to pertussis	Невозможность достичь высокого охвата. Нет четкой возрастной группы для ревакцинации и научных данных о необходимости поддерживать иммунитет прививками раз в 10 лет. Необходимость развития инфраструктуры доставки вакцины Inability to reach high coverage. Lack of verified age group for revaccination and scientific data on the need to maintain durable immunity by immunization every 10 years. The need to develop vaccine delivery infrastructure
2. Выборочная иммунизация матерей и близких родственников, контактирующих с младенцем (стратегия «коккона») 2. Selective immunisation of mothers and close relatives that are in contact with the baby (the «cocoon» strategy)	Сокращение передачи коклюша неиммунизированным или частично иммунизированным детям Reduced pertussis transmission to unimmunized or partially immunized children	Не окажет сильного влияния на заболеваемость подростков и взрослых ввиду относительно небольшой целевой группы Provides no strong impact on the incidence of adolescents and adults due to a relatively small group size
3. Выборочная иммунизация работников здравоохранения 3. Selective immunization of health workers	Исключить возможность внутрибольничного заражения детей младшего возраста коклюшем Avoid an opportunity for intra-hospital pertussis infection in young children	Трудности в разработке индивидуального календаря каждому работнику здравоохранения и соблюдению интервалов между вакцинациями Difficulties in developing an individualized Immunization Schedule for each health worker and in complying with the required inter-vaccination intervals
4. Стратегия перинатального бустера 4. Perinatal booster strategy	Передача антител новорожденному младенцу от матери Maternal antibodies transferred to a newborn	Не известны продолжительность воздействия пассивно приобретенных антител и степень потенциальной реакции младенца на последующую вакцинацию Timeframe of acting passively acquired antibodies and degree of potential reaction emerging in infants after subsequent vaccination are not defined
5. Всеобщая иммунизация подростков (11–12 лет с последующей ревакцинацией в 18 лет) 5. Universal immunization of adolescents (at age of 11–12 years with subsequent revaccination at age of 18 years)	Снизит заболеваемость коклюшем у взрослых, будет способствовать развитию коллективного иммунитета к коклюшу Lowers pertussis incidence in adults; promotes development of pertussis herd immunity	Если стратегия реализуется изолированно, возможен сдвиг пика заболеваемости коклюшем на 19–20 лет In case the strategy is administered as a separate measure, a shift in pertussis incidence may occur at age of 19–20 years
6. Ревакцинация в 4–6 лет 6. Revaccination at age of 4–6 years	Хорошо вписывается в текущие календари прививок ряда стран и может использоваться в виде комбинированных вакцин Fits well into the current vaccination calendar approved in several countries and could be used in the form of combined vaccines	Вызывает опасение возможность локальной реактогенности после четвертой или пятой дозы бесклеточной вакцины. Стратегия реализована во многих странах, однако продолжает регистрироваться младенческая заболеваемость и смертность Potential alert of local reactogenicity after the fourth or fifth dose of acellular pertussis vaccine may emerge. The strategy has been implemented in many countries, but infant pertussis morbidity and mortality rates are still recorded
7. Усиление и/или улучшение существующих стратегий иммунизации младенцев 7. Empower and/or improve existing strategies of infant immunization	Обеспечения высокого охвата вакцинацией эффективной вакциной и введение четвертой дозы вакцины во всех странах мира Ensuring a high vaccine coverage with an effective pertussis vaccine and introduction of a fourth dose of pertussis vaccine in all countries of the worldwide	Стратегия требует эффективной системы мониторинга заболеваемости и иммунитета к коклюшу для постоянной оценки охвата иммунизации, в то время как программы и надзорные протоколы варьируются от страны к стране The strategy requires an effective monitoring system for recording pertussis morbidity and specific immunity to continuously assess immunization coverage, while pertussis programs and surveillance protocols vary between countries

ет система надзора за коклюшной инфекцией, следует обратить внимание на «усиление и/или улучшение существующей стратегии иммунизации младенцев», чтобы обеспечить высокий охват четырьмя дозами вакцины и снизить риск заболеваемости и смертности от коклюша детей. Представляет интерес и стратегия «кокона», учитывая высокий риск инфицирования детей первых месяцев жизни.

Действительно, в России, благодаря обязательной вакцинации против коклюша и повсеместному поддержанию высокого охвата профилактическими прививками, с 2005 г. показатель заболеваемости практически стабилизировался на уровне 3–5 на 100 тыс. населения. Тем не менее анализ и сопоставление экстенсивных и интенсивных возрастных показателей заболеваемости за последние 10 лет свидетельствует о слабо выраженном вовлечении в эпидемический процесс школьников 7–14 лет. Их преобладание в структуре заболевших (в среднем 41,4%) объясняется многочисленностью группы школьников по сравнению с другими возрастными группами детского населения. По высоте интенсивного показателя группой высокого риска заболеваемости коклюшем остаются дети

первого года жизни, преимущественно непривитые, среди которых регистрируется 1–3 летальных случая в год.

Учитывая приведенные данные, полагаем, что России целесообразно изучить возможность использования бесклеточной вакцины в качестве первой вакцинации детям 2–3 месяцев жизни, что, прогнозируемо, увеличит охват прививками этого контингента детей, а также позволит увеличить долю детей, имеющих законченную вакцинацию к 5 месяцам. При этом рациональнее будет сохранить в действующем календаре профилактических прививок количество возрастных групп, подлежащих прививкам против коклюша. Ибо, расширяя возрастные границы вакцинации, мы неизбежно допускаем движение за инфекцией и создаем проблему заболевания коклюшем лиц старшего возраста, у которых диагностика данного заболевания достаточно сложна. Вместе с тем сегодня важно располагать данными об истинной заболеваемости коклюшем, для чего следует проводить полноценный эпидемиологический надзор за инфекцией с использованием современных лабораторных методов диагностики.

Список литературы/References

1. Андерсен Р., Мэй Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль. М.: Научный мир, 2004. 784 с. [Andersen R., Mei R. Infectious diseases of humans. Dynamics and control. Moscow: Scientific World, 2004, 784 p. (In Russ.)]
2. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ — август 2015 г. // Еженедельный эпидемиологический бюллетень. 2015. Т. 90, № 35. С. 433–460. [Pertussis vaccines: WHO position paper. *Ezhenedel'nyj jepidemiologicheskij bjulleten'* = *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2015, vol. 90, no. 35, pp. 433–460. (In Russ.)]
3. Зайцев Е.М. Эпидемический процесс и вакцинопрофилактика коклюша // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2013. № 3. С. 103–110. [Zaitsev E.M. Epidemic process and vaccine prophylaxis of pertussis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 3, pp. 103–110. (In Russ.)]
4. Краснов В.В., Ильянников К.Ф., Павлович Л.Р., Кузмичева М.В. Коклюш у детей первого года жизни // Детские инфекции. 2018. № 1. С. 12–17. [Krasnov V.V., Ilyanikov K.F., Pavlovich L.R., Kuzmicheva M.V. Pertussis in Infants. *Detskie infekcii* = *Children Infections*, 2018, no. 1, pp. 12–17. (In Russ.)]
5. Степенко А.В., Миндлина А.Я. Управление рисками развития эпидемического процесса коклюша: упущенные возможности и новые перспективы // Медицинский альманах. 2017. № 4. С. 83–86. [Stepenko A.V., Mindlina A.Ya. Risk management of the development of epidemiological whooping cough process: lost possibilities and new prospects. *Medicinskij al'manah* = *Medical Almanac*, 2017, no. 4, pp. 83–86. (In Russ.)]
6. Таточенко В.К. Перспективы развития иммунопрофилактики в России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010. № 5. С. 90–98. [Tatochenko V.K. Prospects of the development of immunoprophylaxis in Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, no. 5, pp. 90–98. (In Russ.)]
7. Таточенко В.К., Озерецковский Н.А. Иммунопрофилактика – 2018: справочник, 13-е изд., расширенное. М.: Боргес, 2018. 266 с. [Tatochenko V.K., Ozeretskovskii N.A. Immunoprophylaxis – 2018. Handbook, 13th ed., extended. Moscow: Borges, 2018. 266 p. (In Russ.)]
8. Amirthalingam G., Campbell H., Ribeiro S., Fry N.K., Ramsay M., Miller E., Andrews N. Sustained effectiveness of the maternal pertussis immunization program in England 3 years following introduction. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, vol. 63, pp. 236–243. doi: 10.1093/cid/ciw559
9. Brooks D.A., Clover R. Pertussis infection in the United States role for vaccination of adolescents and adults. *J. Am. Board Fam. Med.*, 2006, no. 19, pp. 603–611.
10. Burdin N., Handy L.K., Plotkin S.A. What is wrong with pertussis vaccine immunity? The problem of waning effectiveness of pertussis vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2017, vol. 9: a029454. doi: 10.1101/cshperspect.a029454
11. Burns D.L., Bruce D. M., Nancy E.M. Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward and gaps in our knowledge. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 209, pp. S32–S35.

12. Crabbe H., Saavedra-Campos M., Verlander N.Q., Leonard A., Morris J., Wright A., Balasegaram S. Are pertussis cases reported too late for public health interventions? Retrospective analysis of cases in London and South East England, 2010 to 2015. *Euro Surveill.*, 2017, vol. 22: 30577. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.29.30577
13. Forsyth K., Tan T., von König C.H., Caro J.J., Plotkin S. Potential strategies to reduce the burden of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2005, vol. 24, pp. 69–74.
14. Gangarosa E.J., Galazka A.M., Wolfe C.R., Phillips L.M., Gangarosa R.E., Miller E., Chen R.T. Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: the untold story. *Lancet*, 1998, vol. 351, pp. 356–361.
15. Hong J. Update on pertussis and pertussis immunization. *Korean J. Pediatr.*, 2010, vol. 53, pp. 629–633.
16. Koufakis Th., Paschala A., Siapardanis D. Pertussis reinfection in an adult: a cause of persistent cough not to be ignored. *Case Rep. Infect. Dis.*, 2017: 4786141.
17. Lasserre A., Laurent E., Turbelin C., Hanslik T., Blanchon T., Guiso N. Pertussis incidence among adolescents and adults surveyed in general practices in the Paris area, France, may 2008 to march 2009. *Euro Surveill.*, 2011, vol. 6: 19783.
18. Liu X.C., Bell C.A., Simmonds K.A., Svenson L.W., Fathima S., Drews S.J., Schopflocher D.P., Russell M.L. Epidemiology of pertussis in Alberta, Canada 2004–2015. *BMC Public Health*, 2017, vol. 17, pp. 1–8.
19. Loch C., Mielcarek N. Live attenuated vaccines against pertussis. *Expert. Rev. Vaccines*, 2014, vol. 13, pp. 1147–1158. doi: 10.1586/14760584.2014.942222
20. Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Zago C.A., Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, vol. 2012: 985646. doi: 10.1155/2012/985646
21. Pertussis in Japan, as of January 2017. *IASR. The Topic of This Month*, 2017, vol. 38, no. 2, pp. 23–24.
22. Pertussis vaccination programme for pregnant women update: vaccine coverage in England. *Health Protection Report*, 2017, vol. 11, no. 19.
23. Pertussis (whooping cough). URL: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/immunization/vaccine-preventable-diseases/pertussis-whooping-cough/health-professionals.html> (20.05.2019)
24. Salisbury D., Ramsay M., Noakes K. Pertussis. In: Immunisation against infectious diseases (The Green Book). London: PHE, 2016, pp. 277–294.
25. Sato Y., Kimura M., Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet*, 1984, vol. 1, pp. 122–126.
26. Skoff T.H., Martin S.W. Impact of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccinations on reported pertussis cases among those 11 to 18 years of age in an era of waning pertussis immunity: a follow-up analysis. *JAMA Pediatr.*, 2016, vol. 170, pp. 453–458.
27. Teepe J., Broekhuizen B.D., Ieven M., Loens K., Huygen K., Kretzschmar M., de Melker H., Butler C.C., Little P., Stuart B., Coenen S., Goossens H., Verheij T.J.; GRACE consortium. Prevalence, diagnosis, and disease course of pertussis in adults with acute cough: a prospective, observational study in primary care. *Br. J. Gen. Pract.*, 2015, vol. 65, pp. 662–667.
28. Van Bellinghen L.A., Dimitroff A., Haberl M., Li X., Manton A., Moeremans K., Demarteau N. Is adding maternal vaccination to prevent whooping cough cost-effective in Australia? *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018, vol. 14, no. 9, pp. 2263–2273. doi: 10.1080/021645515.2018.1474315
29. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2014, vol. 111, pp. 787–792.
30. WHO SAGE pertussis working group. Background paper. SAGE, April, 2014, 82 p. URL: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf (20.05.2019)
31. Winter K., Harriman K., Zipprich J., Schechter R., Talarico J., Watt J., Chavez G. California pertussis epidemic 2010. *J. Pediatr.*, 2012, vol. 161, pp. 1091–1096. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.05.041.

Авторы:

Басов А.А., к.м.н., руководитель лаборатории эпиднадзора за дифтерией и коклюшем ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Цвиркун О.В., д.м.н., руководитель эпидемиологического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Герасимова А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики вирусных инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Зекорева А.Х., врач-эпидемиолог эпидемиологического отдела ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии города Москвы в Северном округе, Москва, Россия.

Authors:

Basov A.A., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Epidemiological Surveillance for Diphtheria and Pertussis, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Tsvircun O.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Epidemiological Department, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Gerashimova A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Viral Infections Prophylaxis, Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Zekoreeva A.Kh., Epidemiologist, Epidemiological Department, Center for Hygiene and Epidemiology of the Moscow in the Northern District, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.04.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 17.04.2019

Received 04.04.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 17.04.2019

БИОРЕГУЛЯЦИЯ АМПЛИТУДНО-ФАЗОВОЙ СТАБИЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *CANDIDA ALBICANS* МИКРОСИМБИОНТАМИ ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА

М.В. Николенко, Н.В. Барышникова, Е.А. Бахлыкова, А.В. Зыкова,
К.В. Романченко

ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Тюмень, Россия

Резюме. В данной работе предложен хронобиологический метод изучения межмикробных взаимодействий в бактериально-грибковых ассоциациях на примере женского репродуктивного тракта. Культуры грибов и бактерий выделены у 45 женщин репродуктивного возраста от 19 до 35 лет, имеющих регулярный менструальный цикл, не пользующихся гормональными контрацептивами, не имеющих в анамнезе гинекологических оперативных вмешательств, аборт, выкидышей с эубиозом и дисбиозом влагалища. У всех пациенток были исключены заболевания, передаваемые половым путем (ВИЧ-инфекция, сифилис, гонорея, трихомоноз, хламидиоз). Активность пролиферации, морфогенеза и фосфолипазы изучали в течение двух суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза Луны. Результаты статистически обработаны с учетом критерия Стьюдента, критерия Уилкоксона, метода наименьших квадратов. В первую группу вошли женщины с эубиозом, вторую группу составили пациентки с дисбиозом влагалища. У всех изучаемых культур *C. albicans* выявлена суточная динамика изучаемых показателей. Грибы, выделенные от здоровых женщин, характеризовались циркадианными (околосуточными) ритмами изучаемых свойств с одним пиком активности. У *C. albicans*, выделенных от женщин с дисбиозом влагалища, выявлены достоверные ультрадианные (около 12-часовые) ритмы с двумя пиками биологической активности всех изучаемых свойств. Согласованность и последовательность проявления физиологических функций клинических изолятов отражала стратегию распределения биологических ресурсов грибов во времени и зависела от формы инфекционного процесса. Экспериментально доказано, что под воздействием экзометаболических доминантной и ассоциативной микробиоты существенных изменений амплитудно-фазовых показателей *C. albicans*, выделенных при эубиозе влагалища, не выявлено. Полученные данные свидетельствовали, что временная организация изучаемых показателей *C. albicans*, выделенных от здоровых лиц, обладала стабильностью и независимостью от воздействия метаболитов бактерий. Иная закономерность установлена при дисбиозе влагалища. Доминантный микросимбионт ингибировал ритмы грибов, что может иметь значение при реализации лактобактериями колонизационной резистентности биотопа. Влияние метаболитов ассоциантов, характерных для дисбиоза, проявлялось повышением значений мезора, амплитуды, сохранением спектрального состава биоритмов изучаемых свойств, амплитудно-фазовой характеристики, что указывало на усиление или сохранение адаптивных

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54,
Тюменский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (3452) 20-04-77 (служебн.); 8 905 823-37-90 (моб.).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Contacts:

Marina V. Nikolenko
625023, Russian Federation, Tyumen, Odesskaya str., 54,
Tyumen State Medical University.
Phone: +7 (3452) 20-04-77 (office); +7 905 823-37-90 (mobile).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Библиографическое описание:

Николенко М.В., Барышникова Н.В., Бахлыкова Е.А., Зыкова А.В., Романченко К.В. Биорегуляция амплитудно-фазовой стабильности биологической активности *Candida albicans* микросимбионтами женского репродуктивного тракта // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 363–368. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-363-368

Citation:

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Bakhlykova E.A., Zyкова A.V., Romanchenko K.V. Bioregulation of amplitude-phase biological activity of *Candida albicans* by women reproductive tract microsymbionts // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 363–368. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-363-368

возможностей *C. albicans*. Следовательно, амплитудно-фазовая характеристика физиологической активности *C. albicans* являлась маркером оппозитного (усиление/ослабление) эффекта выживания микросимбионтов в парах «доминант—ассоциант».

Ключевые слова: *Candida albicans*, микросимбионты, дисбиоз, мезор, акрофаза, амплитудно-фазовые характеристики.

BIOREGULATION OF AMPLITUDE-PHASE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *CANDIDA ALBICANS* BY WOMEN REPRODUCTIVE TRACT MICROSymbionTS

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Bakhlykova E.A., Zykova A.V., Romanchenko K.V.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. In this study, we propose a chronobiological method for examining inter-microbial interactions in bacterial and fungal associations in female reproductive tract. Fungal and bacterial species were isolated in 45 women of reproductive aged 19–35, with regular menstrual cycle, applying no hormonal contraceptives, without previous gynecological surgery, abortions, miscarriages with vaginal eubiosis and dysbiosis in history. Sexually transmitted diseases (HIV infection, syphilis, gonorrhoea, trichomoniasis, chlamydiosis) were excluded in all subjects. Proliferation rate, morphogenesis and phospholipase activity were examined within the 48-hour period every 4 hours, in winter time, Moon phase IV. The data obtained were assessed by using Student's t-test, Wilcoxon test, and least squares method. All subjects were divided into the groups: group 1 — women with vaginal eubiosis, group 2 — women with vaginal dysbiosis. It was shown that in all subjects experimental parameters of *C. albicans* cultures showed a diurnal dynamics characterized in healthy women by circadian rhythms with a single peak of activity. However, in women with vaginal dysbiosis *C. albicans* was characterized by significant ultradian (around 12 hours long) rhythms with two peaks of biological activity. Concurrence and consistency in manifested physiological functions related to clinical isolates was coupled to temporal pattern of distributed biological resources in fungi depending on course of infectious process. It was found that in vaginal eubiosis exometabolites released by dominant associated microbiota did not significantly change microbiota-related amplitude-phase parameters. The data obtained evidenced that temporal pattern of parameters related to *C. albicans* from healthy individuals was stable and independent on bacterial metabolites. In contrast, dominant microsymiont in vaginal dysbiosis inhibited fungi-related rhythms, which might be important in establishing lactobacillus-associated biotope colonization resistance. Effects of metabolites released by the associated microbiota typical to dysbiosis was revealed by increased mesor, amplitude, preserved biorhythm spectral pattern in examined properties as well as amplitude-phase characteristics indicating at enhanced or sustained *C. albicans* adaptive potential. Therefore, the amplitude-phase parameter of *C. albicans* physiological activity served as a marker of opposite (enhanced/weakened) effect of microsymiont survival described in “microbial dominant-associate” pairs.

Key words: *Candida albicans*, microsymionts, dysbiosis, mesor, acrophase, amplitude-phase parameters.

Введение

Повсеместно увеличивающееся число больных вульвовагинальным кандидозом диктует необходимость более тщательного изучения данной проблемы, своевременной и правильной постановки диагноза и проведения рациональной этиотропной терапии [11]. Среди многочисленных возбудителей *Candida* sp. наибольшей патогенностью и вирулентностью обладает *Candida albicans* (*C. albicans*) [5]. С микробиологических позиций остается не до конца изученным вопрос, в какой мере дрожжеподобные грибы можно рассматривать как компонент нормальной микрофлоры влагалища и в каких условиях они выступают уже как возбудители воспалительного процесса. До последнего времени при определении этиологии инфекционных заболеваний женского репродуктивного тракта решающее значение придавали численности обнаруженных условно-патогенных микроорганизмов в пораженном органе, а в случае

микст-инфекции — установлению количественных соотношений между ассоциантами [7, 8]. Известно, что в микросимбиозе между разными видами складываются сложные — конкурентные или кооперативные — взаимоотношения. Эти влияния обусловлены чаще действием легко экстрагируемых метаболитов, которые могут стимулировать или тормозить размножение, усиливать вирулентность возбудителя или способствовать появлению новых факторов, отягощающих болезнь [2].

В настоящий момент проводятся фундаментальные исследования и получены доказательные результаты по изучению взаимоотношений бактерий и грибов рода *Candida* [1, 10]. Однако открытым остается вопрос изменения биологических микромицетов в ассоциациях на протяжении суток. Решение его могло бы раскрыть один из механизмов межмикробных взаимодействий, определяющих формирование и поддержание ассоциативного симбиоза. На наш взгляд, использование инновационных

методов, в частности хронобиологического метода как методического приема, открывает новые перспективы при изучении физиологии *Candida* sp.

Цель — изучить регуляцию амплитудно-фазовой стабильности биологических свойств *C. albicans* микробными метаболитами в микросимбиозе женского репродуктивного тракта.

Материалы и методы

В обследовании приняли участие 45 женщин репродуктивного возраста от 19 до 35 лет. Пациентки имели регулярный менструальный цикл, не использовали гормональные контрацептивы, не имели в анамнезе гинекологических оперативных вмешательств, аборт, выкидышей. У всех женщин были исключены заболевания, передаваемые половым путем (ВИЧ-инфекция, сифилис, гонорея, трихомониаз, хламидиоз).

Влагалищное отделяемое забирали стерильным одноразовым зондом из заднего нижнего свода или с патологически измененных участков слизистой и помещали в пробирки с транспортной средой Эймса. Пробирка маркировалась. Забор материала проводили на базе Областного кожно-венерологического диспансера города Тюмени. Транспортировка биологического материала проводилась в сумке-холодильнике в течение 2 часов в исследовательскую лабораторию кафедры микробиологии Тюменского медицинского университета.

Выделение и идентификацию бактерий микросимбиотомов влагалищного биотопа проводили в соответствии с приказом Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Идентификацию грибов проводили по комплексу признаков: внешний вид колоний, хламидоспорообразование, тест на образование ростовых трубок, чувствительность к антифунгальным препаратам диско-диффузионным методом, ассимиляционная способность [5].

Методом титрования определяли количество *Lactobacillus* sp. (посев на среду МРС); *Peptostreptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp. (посев на среду Шедлера и Колумбия-агар), *Staphylococcus* sp. (посев на 5%-ный кровяной агар), *Candida* sp. (посев на среду Сабуро). Для определения доминирующих морфотипов готовились препараты-мазки, окрашенные по Граму.

Для исследования ритмичности биологических свойств были использованы 18 свежесделанных клинических изолятов *C. albicans*. Активность пролиферации [9], морфогенеза [5]

и фосфолипазы [12] изучали в течение 2 суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза Луны.

Влияние доминантных и ассоциативных бактерий на биологические свойства грибов изучали при добавлении стерильных экзометаболитов (продуктов жизнедеятельности микроорганизмов) в питательный бульон по методу Н.Б. Перуновой [10]. В качестве доминантов использовали *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), ассоциантом являлся *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) № 104.

Статистическую обработку материалов осуществляли с использованием программ: Primer of Biostatics Version 4.03 by Stanton A. Glantz, 1998; Microsoft Office Excel 2010. Определяли M — среднее арифметическое, δ — среднеквадратичное отклонение, m — среднюю ошибку среднего арифметического; данные представляли по форме $M \pm m$ или $M \pm \delta$. В случае соответствия сравниваемых выборок нормальному закону распределения (по χ^2) использовали t -критерий Стьюдента.

Достоверность различий сравниваемых выборок до и после воздействия экзометаболитов доминантов и ассоциантов бактериальной флоры на биологические свойства *C. albicans* определяли непараметрическим методом статистической обработки с учетом критерия Уилкоксона (W). Анализируемые различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для установления связи между параметрами использовали метод ранговой корреляции [3]. Хронодизайн исследований подразумевал получение по каждой оцениваемой функции 6 измерений в сутки с 3–5-кратным повторением условий эксперимента. Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности, $p < 0,05$. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами $T = 12$ ч и $T = 24$ ч: мезор (M) — среднее значение гармонической кривой наилучшей аппроксимации функции (косинусоиды), амплитуду ритма (A) — расстояние от экстремума до мезора и акрофаза (ϕ) — момент времени ожидаемого экстремума функции. Для выявления степени межиндивидуальной синхронизации ритмов использован популяционный косинор-анализ [14].

Результаты и обсуждение

В первую группу вошли 13 женщин (28,8%), у которых в составе микробиоты вагинального отделяемого преобладали *Lactobacillus* sp. в количестве 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. На их долю приходилось — 92,3% от всех выделяемых микроорганизмов. *C. albicans* обнаруживали в количестве 10^1 – 10^2 КОЕ/мл. Облигатная и факульт-

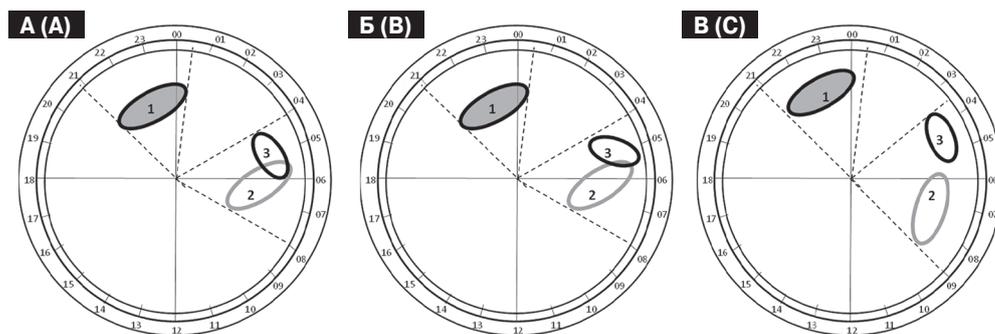


Рисунок 1. Сравнительная характеристика амплитудно-фазовой стабильности биологических свойств изолятов *C. albicans* здоровых пациентов после воздействия экзометаболитов *S. aureus*, T = 24

Figure 1. Comparative characteristics of amplitude-phase stability of biological properties related to *C. albicans* isolates from healthy subjects exposed to *S. aureus* exometabolites, T = 24

Примечания. А) контроль; Б) *L. acidophilus*; В) *S. aureus*; 1) пролиферация; 2) морфогенез; 3) фосфолипаза. По окружности — время суток, часы.

Notes. A) control; B) *L. acidophilus*; C) *S. aureus*; 1) proliferation rate; 2) morphogenesis; 3) phospholipase level. Around the circle: daylight time, hours

тативная анаэробная микрофлора не была обнаружена. Лейкоциты в поле зрения не выявлены. Обнаружение грибов у здоровых людей в 10^2 КОЕ/мл без клинических симптомов и без существенного увеличения количества является показателем носительства [4, 11]. Первая группа рассматривалась нами как контрольная — здоровые женщины с нормоценозом репродуктивного тракта.

Во второй группе у 32 женщин (71,2%) *Lactobacillus* sp. либо отсутствовали, либо высеивались в количестве 10^2 – 10^4 КОЕ/мл. В 87,5% случаев в влагалищном отделяемом обнаружены *Bacteroides* sp., *Gardnereila vaginalis* (*G. vaginalis*), *Staphylococcus* sp. Грибы *C. albicans* выявлены в титре 10^4 – 10^6 КОЕ/мл. Чаще дрожжи высеивались в ассоциации с *S. aureus* — 46,8%. Лейкоцитарная реакция ярко выражена (10–45 лейкоцитов в поле зрения при микроскопии вагинальных мазков). У женщин второй группы выявлен дисбиоз изучаемого биотопа, что становится причиной кандидозных или полимикробных бактериальных вагинозов.

Микробиота влагалища по праву является уникальной моделью для изучения межмикробных взаимоотношений при ассоциативном симбиозе, так как это динамическая равновесная система организма хозяина. В качестве доминантов выбраны *Lactobacillus* sp., именно они важнейшие представители облигатной микрофлоры влагалища. Одной из функций *Lactobacillus* sp. является поддержание нормального микрoэкологического статуса занимаемого биотопа. Микросимбионты *S. aureus* характерны для дисбиоза женского репродуктивного тракта, и обычно обнаруживаемые в большом количестве на фоне дефицита *Lactobacillus* sp. и чаще высеивались с грибами рода *Candida*.

У всех изучаемых культур *C. albicans* выявлена суточная динамика изучаемых показателей. Грибы, выделенные от здоровых женщин, характеризовались циркадианными (околосуточными) ритмами изучаемых свойств с одним пиком активности. Вклад циркадианного ритма составил 59,3–64,5% ($p < 0,05$). В ранние утренние часы зафиксирована максимальная активность фосфолипазы. В вечерне-ночное время, в 20:00, регистрировались максимальные значения пролиферации (рис. 1А). Сравнительный корреляционный анализ при нормоценозе биотопа у *C. albicans* выявил достоверную прямую зависимость между фосфолипазной и морфофункциональной активностью ($r = 0,62$; $p < 0,05$) и четкую обратную корреляцию между пролиферацией и активностью фермента патогенности ($r = -0,53$; $p < 0,05$).

Доказано, что под воздействием экзометаболитов доминантов и ассоциантов существенных изменений амплитудно-фазовых показателей *C. albicans*, выделенных при эубиозе влагалища, не выявлено (рис. 1Б, В).

Не изменялся вклад околосуточного ритма биологических свойств *C. albicans*. Пролиферативная активность микромицетов характеризовалась ночным типом ритмичности. Максимальные значения факторов патогенности регистрировались в ранние утренние часы ($p < 0,05$). По данным корреляционного анализа сохранялась обратная зависимость между показателями пролиферативной активности с одной стороны и остальными биологическими свойствами с другой ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствовали, что временная организация изучаемых показателей *C. albicans*, выделенных из женского репродуктивного тракта здоровых

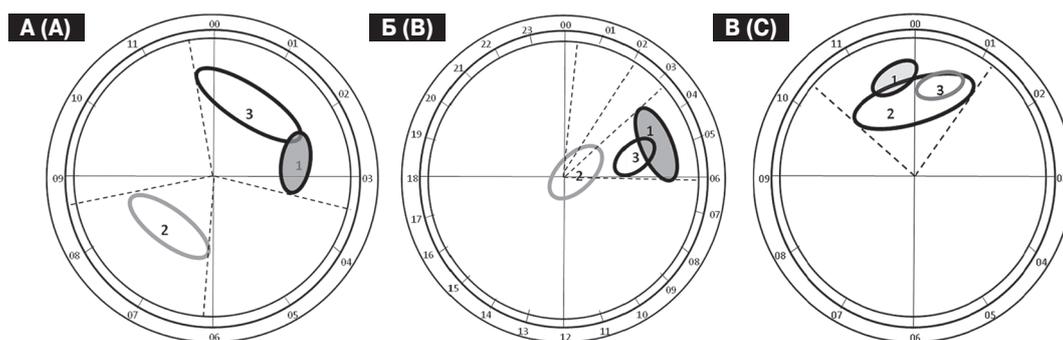


Рисунок 2. Сравнительная характеристика амплитудно-фазовой стабильности биологических свойств изолятов *C. albicans*, выделенных при вагинозе, после воздействия экзометаболитов бактерий

Figure 2. Comparative characteristics of amplitude-phase stability of biological properties of *C. albicans* isolates in vaginosis after exposure to bacterial exometabolites

Примечания. А) контроль; Б) *L. acidophilus*; В) *S. aureus*, 1) пролиферация; 2) морфогенез; 3) фосфолипаза. По окружности — время суток, часы.

Notes. A) control; B) *L. acidophilus*; C) *S. aureus*, 1) proliferation rate; 2) morphogenesis; 3) phospholipase level. Around the circle: daylight time, hours

лиц, обладала стабильностью и, по возможности, независимостью от воздействия метаболитов бактерий. Циркадианный период ритма и стабильно высокие значения амплитуды физиологической активности указывают на адаптацию грибов к определенному микросимбиозу в макроорганизме.

У *C. albicans*, выделенных от женщин с дисбиозом влагалища, выявлены достоверные ультрадианные (около 12-часовые) ритмы с двумя пиками биологической активности всех изучаемых свойств. Вклад ультрадианных гармоник составил 59,7–62,2% ($p < 0,05$). Максимальные значения фосфолипазы регистрировали в дневное (11:00–12:00) и ночное (24:00) время. Акрофаза пролиферативной активности зафиксирована в 16:00 и 24:00 (рис. 2А).

Иная закономерность установлена при воздействии супернатантов микросимбионтов на ритмичные процессы физиологической активности клинических изолятов, полученных от пациентов второй группы. По-видимому, при снижении колонизационной резистентности макроорганизма происходило ослабление регулирующего действия его на биоритмы грибов, и биорегуляторами физиологических функций *C. albicans* выступали микросимбионты. Продукты жизнедеятельности доминантной микробиоты *L. acidophilus* нивелировали ритм морфогенеза, изменили ритмометрические параметры активности адгезии: зафиксирован достоверный циркадианный вклад ритма, снизились показатели мезора и амплитуды ($W = 38,0$; $p < 0,05$) (рис. 2Б).

Установлено, что доминантный микросимбионт ингибирует виды микроорганизмов, часто обнаруживаемые при дисбиозе кишечника, что может иметь значение при реализации

Lactobacillus sp. колонизационной резистентности биотопа. Полученные результаты согласуются с существующим принципом попеременной (асинхронной) работы структур организма [6] и отражают распределение патогенных ресурсов микробных клеток во времени. Так изменения спектрального состава ритмов, мезора, резкое уменьшение амплитуды, асинхронность ритмов вплоть до противофазности характеризуют напряжение адаптации [13]. Известно, что при антагонистическом типе взаимодействия микроорганизмов может происходить модификация антагонистической активности продуцента в связи с активным воздействием на него симбионта: модификация обмена веществ или морфологические и функциональные изменения микросимбионтов [15].

Влияние метаболитов *S. aureus* на физиологические свойства клинических изолятов *C. albicans*, выделенных при дисбиозе влагалища проявлялось повышением значений мезора, амплитуды, сохранением спектрального состава биоритмов изучаемых свойств и амплитудно-фазовой характеристики, что указывало на усиление или сохранение адаптивных возможностей *C. albicans* (рис. 2В).

Корреляционный анализ выявил прямую зависимость между изучаемыми биологическими свойствами у грибов при дисбиозе под воздействием метаболитов *S. aureus* ($r = 0,38–0,91$; $p < 0,05$).

Следовательно, амплитудно-фазовая характеристика физиологической активности *C. albicans* являлась маркером оппозитного (усиление/ослабление) эффекта выживания микросимбионтов в парах «доминант–ассоциант», что, вероятно, можно использовать в практической медицине.

Список литературы/References

1. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцова Н.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с. [Bukharin O.V., Lobakova E.S., Nemtsova N. Associative symbiosis. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2007. 264 p. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В., Лобанова Е.С., Перунова Н.Б., Усвяцов Б.Я., Черкасов С.В. Симбиоз и его роль в инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 301 с. [Bukharin O.V., Lobanova E.S., Perunova N.B., Usvyatsov B.Ya., Cherkasov S.V. Symbiosis and its role in infection. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2011. 301 p. (In Russ.)]
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с. [Glants S. Biomedical statistics. Moscow: Practice, 1999. 459 p. (In Russ.)]
4. Горбасенко Н.В. Современный взгляд на проблему и лечение кандидозных вульвовагинитов // Здоровье Украины. 2006. № 4. С. 24–29. [Gorbashenko N. Modern view on the problem and treatment of Candida vulvovaginitis. Zdorov'e Ukrainy = Health of Ukraine, 2006, no. 4, pp. 24–29. (In Russ.)]
5. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. Candida. Кандидозы. Лабораторная диагностика. Под ред. проф. Н.П. Елинова. СПб.: Коста, 2010. 224 с. [Elinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. Candida. Candidiasis. Laboratory diagnostics. Ed. prof. N.P. Elinov. St. Petersburg: Costa, 2010. 224 p. (In Russ.)]
6. Комаров Ф.И., Рапорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. М.: Триада-Х, 2000. С. 9–24. [Komarov F.I., Raport S.I. Chronobiology and chronomedicine. Moscow: Triada-X, 2000. С. 9–24. (In Russ.)]
7. Куперт А.Ф., Киборт Р.В., Попова Н.В., Платонова Т.А., Филатова Л.С. Видовой состав возбудителей вагинального кандидоза у пациенток отделения оперативной гинекологии // Гинекология. 2004. Т. 6, № 4. С. 184–187. [Kupert A.F., Sibort R.V., Popova N.V., Platonova T.A., Filatova L.S. The species composition of causative agents of vaginal candidiasis in female patients of the Department of operative gynecology. Ginekologiya = Gynecology, 2004, vol. 6, no. 4, pp. 184–187. (In Russ.)]
8. Николенко М.В., Тимохина Т.Х., Варницына В.В. Хронобиологические методы изучения биологических свойств грибов Candida albicans, выделенных из вагинального биотопа // Вестник Ивановской медицинской академии. 2012. Т. 17, № 2. С. 12–15. [Nikolenko M.V., Timokhina T.Kh., Varnitsyna V.V. Chronobiological methods of studying the biological properties of fungi Candida albicans isolated from vaginal biotope. Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii = Bulletin of the Ivanovo Medical Academy, 2012, vol. 17, no. 2, pp. 12–15. (In Russ.)]
9. Патент на изобретение № 2285258. Способ диагностики госпитальных штаммов. 2006. 11 с. [The patent for the invention № 2285258. Method of diagnosis of hospital strains. 2006. 11 p.]
10. Перунова Н.Б. Механизмы формирования ассоциативного симбиоза в бактериально-грибковых сообществах человека // Медицинская наука и образование Урала. 2009 № 3. С. 45–46. [Perunova N.B. Mechanisms of formation of associative symbiosis in bacterial and fungal human communities. Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urала = Medical Science and Education of the Urals, 2009, no. 3, pp. 45–46. (In Russ.)]
11. Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р. Вульвовагинальный кандидоз — современные пути решения проблемы // Трудный пациент. 2006. Т. 9, № 4. С. 33–40. [Prilepskaya V.N., Bayramova G.R. Vulvovaginal candidiasis—modern ways of solving the problem. Tрудnyj pacient = Difficult Patient, 2006, vol. 9, no. 4, pp. 33–40. (In Russ.)]
12. Суплотов С.Н., Журавлева Т.Д. Адаптация человека к авиаполетам. Липопероксидация в эритроцитах и ее регуляция. Методы лабораторной диагностики. Тюмень: ООО «Печатник». 2009. 104 с. [Suplotov S.N., Zhuravleva T.D. Adaptation of man to air travels. Lipoperoxidation in erythrocytes and its regulation. Methods of laboratory diagnostics. Tyumen: Pechatnik, 2009. 104 p. (In Russ.)]
13. Хетагурова Л.Г., Салбиев К.Д., Беляев С.Д. Хронопатология: экспериментальные и клинические аспекты. М.: Наука, 2004. 355 с. [Khetagurova L.G., Salbiev K.D., Belyaev S.D. Chronopatology: experimental and clinical aspects. Moscow: Nauka, 2004. 355 p. (In Russ.)]
14. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K. Methods for cosinorhythmometry. Chronobiologia, 1979, vol. 6, no. 4, pp. 305–323.
15. Shank A.E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. Curr. Opin. Microbiol., 2009, vol. 12, no. 2, pp. 205–214.

Авторы:

Николенко М.В., д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии Тюменского государственного медицинского университета, г. Тюмень, Россия;

Барышникова Н.В., ассистент кафедры микробиологии Тюменского государственного медицинского университета, г. Тюмень, Россия;

Бахлыкова Е.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней с курсами детских инфекций, дерматовенерологии и косметологии Тюменского государственного медицинского университета, г. Тюмень, Россия;

Зыкова А.В., ординатор кафедры инфекционных болезней с курсами детских инфекций, дерматовенерологии и косметологии Тюменского государственного медицинского университета, г. Тюмень, Россия;

Романченко К.В., ординатор кафедры инфекционных болезней с курсами детских инфекций, дерматовенерологии и косметологии Тюменского государственного медицинского университета, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Nikolenko M.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Baryshnikova N.V., Assistant Professor, Department of Microbiology of Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Bakhlykova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Children's Infections, Dermatovenereology and Cosmetology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Zykova A.V., Resident Physician, Department of Infectious Diseases with Courses of Children's Infections, Dermatovenereology and Cosmetology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Romanchenko K.V., Resident Physician, Department of Infectious Diseases with Courses of Children's Infections, Dermatovenereology and Cosmetology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.06.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 22.06.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 09.04.2019

ВОСПАЛЕНИЕ, ИНДУЦИРОВАННОЕ РАЗНЫМИ ПЛАЗМИДНЫМИ ТИПАМИ РОССИЙСКИХ ШТАММОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Л.М. Сомова¹, Ф.Н. Шубин¹, Е.И. Дробот¹, И.Н. Ляпун¹, Н.Г. Плехова^{1,2}

¹ ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

² ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия

Резюме. В 2000-х годах значительно повысился интерес к дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке (ДСЛ), регистрирующейся в основном в России и Японии. Это клинико-эпидемическое проявление псевдотуберкулеза у человека связано с конкретной клональной линией возбудителя болезни, характеризующейся определенным плазмидным профилем (pVM82, pYV48), сиквенс-типом (2ST) и аллелем гена *yadA* (1-й аллель). В работе изучены особенности воспалительных изменений, характеризующих плазмид-ассоциированную патогенность возбудителя ДСЛ. Исследована патоморфология органов экспериментальных животных, инфицированных внутрибрюшинно штаммами *Yersinia pseudotuberculosis* 4 плазмидных типов: 48⁺:82⁺; 48⁺:82⁻; 48⁻:82⁺; 48⁻:82⁻. При заражении животных штаммом Н-5015 Т⁺ (82⁺:48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, содержащим две плазмиды с молекулярной массой 82 и 48 МДа, летальность составила 40%. С 3 суток инфекции обнаружена картина диффузной пневмонии с умеренной воспалительной инфильтрацией легочной ткани и изменения в лимфоидных органах, характеризующие иммунодефицит. При заражении штаммом Н-5015 Т⁻ (82⁺:48⁻) *Y. pseudotuberculosis* с одной плазмидой pVM82 МДа летальность составила 30%. С 3 суток инфекции выявлялась сосудистая реакция в легких и печени, на 5–7 сутки усиливались деструктивные изменения стенки сосудов. На этом фоне отмечалась периваскулярная инфильтрация преимущественно мононуклеарными клетками с явлениями очаговой пневмонии, реакция бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани, минимальные деструктивные изменения в органах. На 7 сутки инфекции в печени обнаружены признаки гранулематозного воспаления в виде мелких скоплений мононуклеарных клеток и околососудистых компактных инфильтратов. Во все сроки инфекции отмечалась гиперплазия ткани лимфоидных органов. При инфекции, вызванной штаммом Н-5013 Т⁺ (48⁺), летальность составила 80%. Воспалительные изменения с преобладанием мононуклеарных клеток обнаружены уже через 1 сутки после заражения с картиной крупноочаговой бронхопневмонии, более выраженной у павших животных. У последних также отмечены признаки выраженной иммуносупрессии в лимфоидных органах. С 3 суток инфекции у всех зараженных животных обнаружена лимфоидная гипоплазия в селезенке и лимфоузлах на фоне патоген-ассоциированного повреждения ткани органов. После заражения бесплазмидным штаммом Н-5013 Т⁻ (48⁻) летальность составила 25%. С 3 суток инфекции имелась незначительная мононуклеарная воспалительная инфильтрация в легких и печени, умеренная гигантоклеточная реакция в пульпе селезенки и рыхлая перинодальная воспалительная инфильтрация лимфатических узлов. Таким образом, при моделировании инфекции, вызванной разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis* получены данные о различиях морфогенеза изменений в органах экспериментальных животных, касающиеся динамики и генерализации воспалительной реакции, а также тяжести патоген-ассоциированных повреждений лимфоидной ткани. При наличии в штаммах *Y. pseudotuberculosis* плазмиды pVM82, в комплексе с плазмидой вирулентности pYV или без нее, уменьшалась распространенность воспалительной реакции и выраженность иммуносупрессии,

Адрес для переписки:

Сомова Лариса Михайловна
690087, Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, 1,
ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.
Тел.: 8 (423) 244-14-38 (служебн.).
E-mail: l_somova@mail.ru

Contacts:

Larisa M. Somova
690087, Russian Federation, Vladivostok, Selskaya str., 1,
Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (423) 244-14-38 (office).
E-mail: l_somova@mail.ru

Библиографическое описание:

Сомова Л.М., Шубин Ф.Н., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Плехова Н.Г.
Воспаление, индуцированное разными плазмидными типами
российских штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* // Инфекция
и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 369–374. doi: 10.15789/2220-7619-2019-
2-369-374

Citation:

Somova L.M., Shubin F.N., Drobot E.I., Lyapun I.N., Plekhova N.G.
Inflammation induced by different plasmid types of russian *Yersinia*
pseudotuberculosis strains // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 369–374. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-2-369-374

проявляющейся делимфатизацией селезенки и лимфатических узлов, по сравнению с инфекцией, вызванной штаммом *Y. pseudotuberculosis*, несущим единственную плазмиду вирулентности pYV. Сделано предположение о значении плазмиды pVM82, присутствующей в российских штаммах *Y. pseudotuberculosis*, в ограничении воспалительной реакции, бактериальной диссеминации и тяжести повреждения лимфоидных органов.

Ключевые слова: псевдотуберкулез, дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка, *Yersinia pseudotuberculosis*, плазмидные типы, воспаление, клетки врожденного иммунитета, иммуносупрессия.

INFLAMMATION INDUCED BY DIFFERENT PLASMID TYPES OF RUSSIAN *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* STRAINS

Somova L.M.^a, Shubin F.N.^a, Drobot E.I.^a, Lyapun I.N.^a, Plekhova N.G.^{a,b}

^a Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

^b Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. In the 2000s, a scientific interest to the Far Eastern scarlet-like fever (FESLF) mainly recorded in Russia and Japan was remarkably increased. Such clinical and epidemic manifestation of human pseudotuberculosis is related to a certain bacterial clonal lineage characterized by a specific plasmid profile (pVM82, pYV48), sequence type (2ST) as well as the *yadA* gene allele (1st allele). In our study we examined features of inflammatory changes characterizing plasmid-associated pathogenicity of the FESLF pathogen. In addition, organ histopathology in experimental animals infected intraperitoneally with *Y. pseudotuberculosis* strains of the four plasmid types 48⁺:82⁺; 48⁺:82⁻; 48⁻:82⁺; and 48⁻:82⁻ was investigated. It was found that the mortality rate in animals infected with *Y. pseudotuberculosis* H-5015 strain (82⁺:48⁺) bearing two plasmids with a molecular weight of 82 and 48 MDa was 40%. A picture of diffuse pneumonia with moderate inflammatory infiltration in pulmonary tissue and changes in lymphoid organs characterizing immunodeficiency we observed as early as 3 days postinfection (p.i.). On the contrary, animals infected with *Y. pseudotuberculosis* H-5015 strain (82⁺:48⁻) bearing a single plasmid 82 MDa pVM, mortality rate was 30%. A vascular reaction in the lungs and liver as well as deteriorated vascular destructive changes were revealed starting from day 3 and on day 5–7 days p.i., respectively, which was paralleled with perivascular infiltration mainly by mononuclear cells and focal pneumonia as well as a reaction of bronchial-associated lymphoid tissue and minimal organ destructive changes. On day 7 p.i., signs of granulomatous inflammation in the liver in a form of small mononuclear cell clusters and perivascular compact infiltrates were found. At all time points, lymphoid organ hyperplasia was noted. In case the infection caused by H-5013 strain (48⁺), the mortality rate was 80%. Inflammatory changes with dominant mononuclear cells were detected as early as 1 day p.i. associated with a picture of large focal bronchopneumonia, more pronounced in the non-survivor animals, also demonstrating signs of severe immunosuppression in the lymphoid organs. Starting from day 3 p.i., lymphoid hypoplasia in the spleen and lymph nodes was detected in all infected animals paralleled with pathogen-associated tissue damage in various organs. Animals infected with the plasmid-free H-5013 strain (48⁻) resulted in 25% mortality rate. Moreover, starting from day 3 p.i., a slight mononuclear inflammatory infiltration in the lungs and liver, a moderate giant cell reaction in the splenic pulp, and loose perinodal inflammatory infiltration in the lymph nodes were observed. Thus, while modeling infection caused by different plasmid types of *Y. pseudotuberculosis*, the data on differences in histopathology of changes in diverse organs regarding dynamics and generalization of the inflammatory response, as well as the severity of pathogen-associated damage in the lymphoid tissue were obtained. In case *Y. pseudotuberculosis* strains contained pVM82 plasmid with or without virulence plasmid pYV vs. single pYV-positive strains, an area of the inflammatory response as well as severity of immunosuppression manifested by splenic and lymph node delymphatization were decreased. It allowed to suggest that pVM82 plasmid found in Russia-originating *Y. pseudotuberculosis* strains might be implicated in limiting intensity of inflammatory response, bacterial dissemination and severity of lymphoid organ damage.

Key words: pseudotuberculosis infection, Far Eastern scarlet-like fever (FESLF), *Yersinia pseudotuberculosis*, plasmid types, inflammation, innate immunity cells, immunosuppression.

Введение

В 2000-х годах значительно повысился интерес к дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке (ДСЛ), регистрирующейся в основном в России и Японии. Это клинико-эпидемическое проявление псевдотуберкулеза у человека связано с конкретной клональной линией возбудителя болезни, характеризующейся определенным плазмидным профилем (pVM82, pYV48), сиквенс-типом (2ST) и аллелем гена *yadA* (1-й аллель) [13]. Дальневосточная скарлатинопо-

добная лихорадка является генерализованным инфекционным заболеванием, отличающимся от спорадического псевдотуберкулеза в Европе, протекающего часто в форме гастроэнтерита. Идентифицированы ДСЛ-ассоциированные геномные элементы *Y. pseudotuberculosis*, включающие плазмиды pYV и pVM82, кодирующие спектр факторов патогенности возбудителя [5]. Плазмиды выявлены автором у 99% штаммов *Y. pseudotuberculosis* серовара 1, и наиболее часто выявляемыми были плазмиды вирулентности *Y. pseudotuberculosis* (pYV) с молекуляр-

ной массой (м.м.) 45–48 МДа, и плазида с м.м. 82 МДа (pVM82), являющаяся специфичной для российских штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Заболеваемость псевдотуберкулезом в виде эпидемических вспышек (ДСЛ) обуславливает, в основном, плазмидный тип pYV48: pVM82 [3]. Дальневосточные штаммы, несущие эти плазмиды, продуцируют суперантиген YPMa, *Y. pseudotuberculosis*-производный митоген А, играющий, вероятно, ключевую роль в иммунопатогенезе ДСЛ [6].

Плазида вирулентности pYV кодирует белок наружной мембраны YadA, являющийся ведущим адгезином иерсиний, а также 7 разновидностей белков наружной мембраны Yops, которые представляют собой комплекс факторов, предназначенных для нейтрализации иммунокомпетентных клеток, а также запускающих апоптоз макрофагов и систему секреции III типа [7, 8, 12]. Патогенные виды *Yersinia* преимущественно нацелены на клетки врожденной иммунной системы и инактивируют их, ослабляя врожденный иммунный ответ [10]. Важно, что Yop-эффекторы, детерминированные плазмидой pYV, позволяют *Y. pseudotuberculosis* избегать воздействия нейтрофилов, имеющих существенное значение в ограничении диссеминации бактерий [14]. Менее изучена плазида pVM82 *Y. pseudotuberculosis*, которая не встречается у других представителей рода *Yersinia* [5]. Авторами показано, что среди природных штаммов *Y. pseudotuberculosis* встречается плазида с м.м. 57 МДа, которая не коррелирует с эпидемичностью штаммов и является фрагментом плазмиды pVM82 вместе с фрагментом ДНК в 25 МДа. Было установлено [1], что в присутствии плазмиды pVM82, содержащей этот фрагмент, подавляется образование антител к ряду основных антигенов *Y. pseudotuberculosis*. Нами установлены особенности метаболической активности клеток врожденного иммунитета, инфицированных разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, которые свидетельствуют об угнетении бактерицидной способности фагоцитов [4], что имеет значение в патогенезе данной инфекции.

Цель работы: выявление особенностей воспалительной реакции при псевдотуберкулезе в зависимости от плазмидного спектра возбудителя и поиск дополнительных эффектов, связанных с плазмидой pVM82 *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы

Для воспроизведения экспериментальной инфекции внутрибрюшинно заражали беспородных белых мышей женского пола массой 18–20 г (200 особей). Животные находились на стандартной диете, содержались в боксированных помещениях с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции.

Использованы штаммы 4 плазмидных типов *Y. pseudotuberculosis*, полученные из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова: 1) штамм Н-5015 T⁺ (82⁺:48⁺), содержащий две плазмиды pVM82 и pYV, LD₅₀ составила 3,7 × 10⁷, и 2) его изогенный штамм Н-5015 T⁻ (82⁺:48⁻), содержащий одну плазмиду pVM82; 3) штамм Н-5013 T⁺ (48⁺), содержащий только плазмиду pYV, LD₅₀ составила 1,4 × 10⁸, и 4) его изогенный бесплазмидный штамм Н-5013 T⁻ (48⁻). Заражающая доза была равна 10-кратной LD₅₀ штаммов, вызывающей системную бактериальную инфекцию [11]. На 1, 3, 5 и 7 сутки после заражения брали кусочки легкого, печени, селезенки и брыжеечные лимфатические узлы, фиксировали их в 10% растворе формалина, забуференного по Лилли, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали, окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты

При заражении животных штаммом Н-5015 T⁺ (82⁺:48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, содержащим две плазмиды с молекулярной массой 82 и 48 МДа, на 5–7 сутки наблюдалась гибель мышей, летальность составила 40%. При гистологическом исследовании с 3 суток инфекции обнаружены диффузная пневмония с полиморфноклеточной (нейтрофилы, макрофаги) инфильтрацией легочной ткани (рис. 1А) и изменения в лимфоидных органах, характеризующие иммунодефицит. Эти изменения, связанные с бактериальной диссеминацией, были сильнее выражены у погибших животных. Колонии бактерий визуализировались в виде гомогенных пятен (рис. 1Б, В), что придавало ткани лимфоидных органов (селезенка, лимфоузлы) вид «изъеденных молью» (по терминологии F. Guinet и соавт., 2008) [9]. У павших животных наблюдалось сходство морфологической картины геморрагической пневмонии с поражением легких при *Y. pestis*-инфекции.

При инфекции, вызванной штаммом Н-5013 T⁺ (48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, несущим единственную плазмиду вирулентности pYV с молекулярной массой 48 МДа, гибель животных отмечали уже с 1 суток инфекции, летальность составила 80%. Генерализованная воспалительная реакция с преобладанием мононуклеарных клеток обнаружена через 1 сутки после заражения с картиной крупноочаговой бронхопневмонии (рис. 2А), более выраженной у павших мышей, у которых также отмечено выраженное разрежение ткани лимфоидных органов (рис. 2Б). С 3 суток у всех животных обнаружена гипоплазия селезенки и лимфатических узлов.

При заражении штаммом Н-5015 T⁻ (82⁺:48⁻) *Y. pseudotuberculosis*, несущим только плазмиду

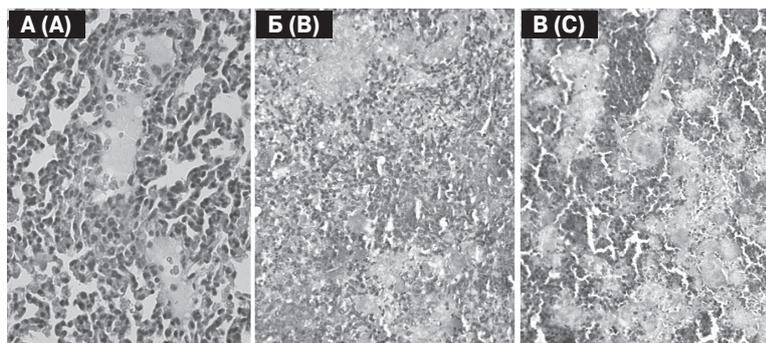


Рисунок 1. Легкое (А) и селезенка (Б, В) животных, зараженных штаммом Н-5015 Т⁺ (82⁺:48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, 5 суток после заражения, х200. Окраска гематоксилином и эозином

Figure 1. Histopathology analysis of the lung (A) and spleen (B, C) sections obtained from animals infected with strain H-5015 T⁺ (82⁺: 48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, day 5 p.i. Magnification x200. Stained with hematoxylin and eosin

рVM82, гибель животных отмечалась с 5 суток после заражения, летальность составила 30%. Патоморфологические изменения выявлялись с 3 суток в виде сосудистой реакции в легких, печени и усилением ее с деструктивным изменением сосудистой стенки на 5–7 сутки наблюдения. На этом фоне отмечались воспалительные изменения с периваскулярной инфильтрацией преимущественно мононуклеарными клетками, явлениями очаговой пневмонии (рис. 3А) и реакцией бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани при незначительных деструктивных изменениях в органах. Выраженные изменения наблюдались лишь у павших мышей в виде серозно-геморрагической пневмонии, вероятно, как проявления инфекционно-токсического шока, с диффузной рыхлой моноцитарно-лимфоцитарной инфильтрацией легкого. Важно отметить, что в печени воспалительные изменения на 7 сутки имели признаки гранулематозного воспаления в виде мелких скоплений мононуклеарных клеток (рис. 3Б) и компактных околососудистых инфильтратов. Во все сроки инфекции отмечалась гиперплазия ткани лимфоидных органов (рис. 3В, Г). Лишь у павших на 5–7 сутки мышей обнаружена картина септической селезенки с гипоплазией лимфоидных фолликулов при минимальной воспалительной реакции.

После заражения бесплазмидным штаммом Н-5013 Т⁻ (48⁻) *Y. pseudotuberculosis* гибель животных наблюдалась на 5–7 сутки инфекции, летальность составила 25%. С 3 суток после заражения выявлена умеренная сосудистая реакция в органах, незначительная мононуклеарная воспалительная инфильтрация в легких и печени, умеренная гигантоклеточная реакция в пульпе селезенки и рыхлая перинодальная лимфоидная инфильтрация лимфатических узлов. У павших на 5–7 сутки животных обнаружены резкая сосудистая реакция с деструкцией стенки сосудов, геморрагическое пропитывание легочной ткани и минимальная воспалительная реакция, а также лимфоидная гипоплазия в селезенке и лимфатических узлах.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствовали о зависимости гистопатологии псевдотуберкулезной инфекции от плазмидного типа возбудителя. Наибольшая летальность (80%) наблюдалась при инфекции, вызванной одноплазмидным штаммом Н-5013 Т⁺ (48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, несущим единственную плазмиду вирулентности рYV, которая характеризовалась воспалительными изменениями в органах с преоб-

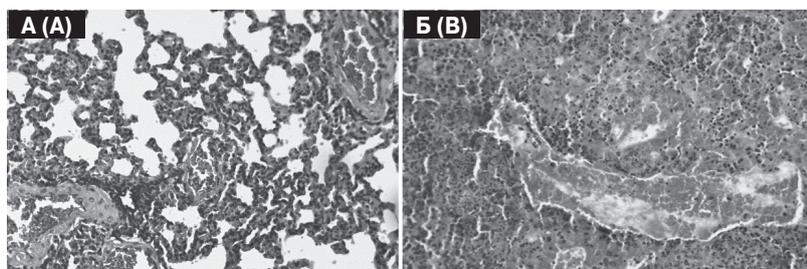


Рисунок 2. Легкое (А) и селезенка (Б) животных, зараженных штаммом Н-5013 Т⁺ (48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, 5 суток после заражения, х200. Окраска гематоксилином и эозином

Figure 2. Histopathology analysis of the lung (A) and spleen (B) sections obtained from animals infected with strain H-5013 T⁺ (48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, day 5 p.i. Magnification x200. Stained with hematoxylin and eosin

ладанием мононуклеарных клеток, начиная с 1 суток после заражения, и развитием с 3 суток инфекции выраженной делимфатизации в селезенке и лимфатических узлах, свидетельствующей о выраженной иммуносупрессии. При инфекции, вызванной двухплазмидным штаммом Н-5015 (82⁺:48⁺) *Y. pseudotuberculosis*, летальность была в 2 раза меньше, по сравнению с одноплазмидным штаммом 5013 Т⁺ (48⁺), наблюдались воспалительные изменения с участием нейтрофилов и макрофагов, деструктивные повреждения лимфоидных органов разной степени тяжести у выживших и павших животных. Сходные показатели летальности выявлены нами ранее при оральной инфекции у кроликов, вызванной такими же плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, несущими одну плазмиду с молекулярной массой 48 МДа и две плазмиды с массой 48 и 82 МДа [2].

При заражении штаммом Н-5015 Т⁻ (82⁺:48⁻) *Y. pseudotuberculosis*, несущим единственную плазмиду рVM82, патология в органах проявлялась менее острым воспалением с преобладанием мононуклеаров, без гипоплазии лимфоидных органов, с минимальными некротическими изменениями тканей. Выраженные изменения с явлениями инфекционно-токсического шока, гипоплазией лимфоидных органов при минимальной воспалительной реакции наблюдались лишь у павших животных. Инфицирование бесплазмидным штаммом

Н-5013 Т⁻ (48⁻) *Y. pseudotuberculosis* вызвало незначительную органопатологию со слабой воспалительной реакцией без явлений иммуносупрессии, и лишь у 1/4 животных летальную инфекцию. Можно предположить, что значение плазмиды рVM82, присутствующей в российских штаммах *Y. pseudotuberculosis*, связано с уменьшением остроты воспалительной реакции, бактериальной диссеминации и тяжести патоген-ассоциированных повреждений лимфоидных органов. В определенной мере это объясняет редкость септических осложнений и низкую летальность при ДСЛ [2].

Таким образом, при моделировании инфекции, вызванной разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, получены данные о различиях морфогенеза изменений в органах-мишенях экспериментальных животных, касающиеся динамики и генерализации воспалительной реакции, а также тяжести патоген-ассоциированных повреждений лимфоидной ткани. При наличии в штаммах *Y. pseudotuberculosis* плазмиды рVM82 в комплексе с плазмидой вирулентности рYV молекулярной массой 48 МДа или без нее, уменьшалась распространенность воспалительной реакции и выраженность иммуносупрессии, проявляющейся делимфатизацией селезенки и лимфатических узлов, по сравнению с инфекцией, вызванной штаммом *Y. pseudotuberculosis*, несущим единственную плазмиду вирулентности рYV.

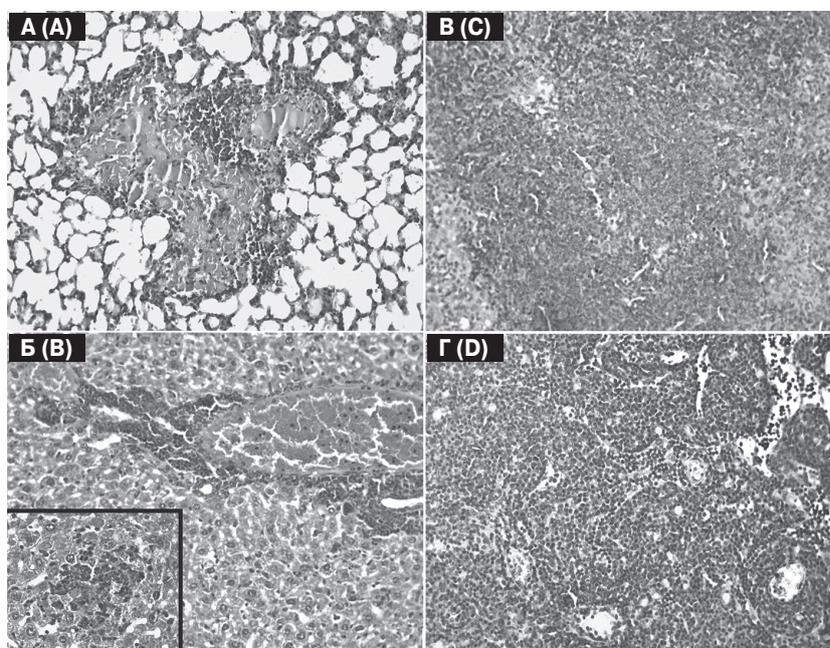


Рисунок 3. Легкое (А), печень (Б), селезенка (В) и лимфатический узел (Г) животных, зараженных штаммом Н-5015 Т⁻ (82⁺:48⁻) *Y. pseudotuberculosis*, 5 сутки после заражения, х200; 2Б, вставка, — х400. Окраска гематоксилином и эозином

Figure 3. Histopathology analysis of the lung (A), liver (B), spleen (C), and lymph node (D) sections obtained from animals infected with strain Н-5015 Т⁻ (82⁺; 48⁻) *Y. pseudotuberculosis*, day 5 p.i. Magnification x200; 2B, inset, — x400. Stained with hematoxylin and eosin

Список литературы/References

1. Гинцбург А.Л., Шубин Ф.Н., Шовадаева Г.А., Куличенко А.Н., Янишевский Н.В. Новый признак патогенности, кодируемый плазмидой pVM82 *Yersinia pseudotuberculosis* // Генетика. 1988. Т. 24, № 9. С. 1562–1571. [Gintsburg A.L., Shubin F.N., Shovadaeva G.A., Kulichenko A.N., Yanishevsky N.V. A new trait of pathogenicity, encoded by pVM82 plasmid of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genetika = Genetics*, 1988, vol. 24, no. 9, pp. 1562–1571. (In Russ.)]
2. Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994. 190 с. [Isachkova L.M., Zhavoronkov A.A., Antonenko F.F. Pathology of pseudotuberculosis. *Vladivostok: Dal'nauka*, 1994. 190 p. (In Russ.)]
3. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 253 с. [Somov G.P., Pokrovskiy V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. Pseudotuberculosis. *Moscow: Medicina*, 2001. 253 p. (In Russ.)]
4. Сомова Л.М., Шубин Ф.Н., Дробот Е.И., Плехова Н.Г., Ляпун И.Н. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 6. С. 74–84. [Somova L.M., Shubin F.N., Drobot E.I., Plekhova N.G., Lyapun I.N. Plasmid-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and infectious process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 6, pp. 74–84. (In Russ.)]
5. Шубин Ф.Н., Гинцбург А.Л., Китаев В.М., Янишевский Н.В., Зенкова З.Г. Анализ плазмидного состава штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и его применение для типирования возбудителя псевдотуберкулеза // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 1989. № 6. С. 20–25. [Shubin F.N., Gintsburg A.L., Kitaev V.M., Yanishevskiy N.V., Zenkova Z.G. Analysis of the plasmid composition of *Yersinia pseudotuberculosis* strains and its use for typing the causative agent of pseudotuberculosis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya, virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology, Virology*, 1989, no. 6, pp. 20–25 (In Russ.)].
6. Amphlett A. Far East scarlet-like fever: a review of the epidemiology, symptomatology, and role of superantigenic toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen A. *Open Forum Infect. Dis.*, 2016, vol. 3, iss. 1. doi: 10.1093/ofid/ofv202
7. Brodsky I.E., Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits in vivo cell death but enhances bacterial virulence. *PLoS Pathog.*, 2008, vol. 4: e1000067.
8. Cornelis G. The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular 'toxin' delivery. *Biol. Chem.*, 2010, vol. 391, no. 7, pp. 745–51. doi: 10.1515/bc.2010.079
9. Guinet F., Ave P., Jones L., Huerre M., Carniel E. Defective innate cell response and lymph node infiltration specificity *Yersinia pestis* infection. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 2: e1688. doi: 10.1371/journal.pone.0001688
10. Marketon M.M., DePaolo R.W., DeBord R.W., Jabre B., Schneewind O. Plaque bacteria target immune cells during infection. *Science*, 2005, vol. 309, pp. 1739–1741. doi: 10.1126/science.1114580
11. Navarini A.A., Lang K.S., Verschoor A., Recher M., Zinkernagel A.S., Nizet V., Odermatt B., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *PNAS*, 2009, vol. 106, no. 17, pp. 7107–7112. doi: 10.1073/pnas.0901162106
12. Peters K.N., Dhariwala M.O., Hughes-Hanks J.M. Early apoptosis of macrophages modulated by injection of *Yersinia pestis* YopK promotes progression of primary pneumonic plague. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 4: e1003324. doi: 10.1371/journal.ppat.1003324
13. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Popov A.F., Psareva E.K., Sobyenin K.A., Gintsburg A.L., Ermolaeva S.A. Far East scarlet-like fever caused by a few related genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 3, pp. 503–506. doi: 10.3201/eid2203.150552
14. Westermarck L., Fahlgren A., Fallmana M. *Yersinia pseudotuberculosis* efficiently escapes polymorphonuclear neutrophils during early infection. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 3, pp. 1181–1191. doi: 10.1128/IAI.01634-13

Авторы:

Сомова Л.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Шубин Ф.Н., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия;

Дробот Е.И., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Ляпун И.Н., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Плехова Н.Г., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия; зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Somova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Shubin F.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Drobot E.I., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Lyapun I.N., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Plekhova N.G., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation; Head of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.06.2018
Отправлена на доработку 26.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 19.06.2018
Revision received 26.03.2019
Accepted 09.04.2019

ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУЧАЕВ ОСТРОЙ ДИАРЕИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ С ПОЗИТИВНОЙ РЕАКЦИЕЙ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА НОРОВИРУС

Е.А. Кожухова¹, И.В. Горбова²

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

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

Резюме. В отношении пока неуправляемой норовирусной инфекции имеет место отчетливая тенденция к увеличению частоты ее регистрации, в том числе среди взрослых. При позитивной реакции клинического материала на норовирус симптоматика острой диареи у взрослых нередко отличается от классического патогенетически обусловленного течения норовирусной инфекции, что делает целесообразным проведение клинико-лабораторных сопоставлений. Проводили когортное ретроспективное исследование. Анализировали результаты клинико-лабораторного обследования 146 госпитализированных взрослых больных острой кишечной инфекцией (ОКИ) средней тяжести, в клиническом материале которых (фекалиях) выявляли маркер возбудителя норовирусной инфекции. Специфическое обследование для выявления различных возбудителей острой диареи наряду с классическими стандартными методами (культуральный, серологический на основе определения специфических антител в диагностическом титре или при его 4-кратном приросте, иммуноферментный) включало исследование фекалий пациента методом ПЦР с использованием набора «Амплиценс®ОКИ скрин-FL» (Интерлабсервис, Россия). Анализ результатов обследования показал, что наряду с генетическим маркером норовируса у 54,1% взрослых больных острой диареей одновременно выявляли другие энтеропатогены, в том числе бактериальные — более чем у трети (36,3%) пациентов. В клиническом материале пациентов, поступивших на 4 день острой диареи и позднее (в сравнении с теми, кто поступал в первые 3 дня болезни), значимо чаще (в 1,5 раза) выявляли ассоциацию норовируса с другими возбудителями острой кишечной инфекции ($p = 0,03$), преимущественно за счет ассоциации с астровирусом (ПЦР-методом) ($p = 0,04$) и с *Shigella* spp. (культуральным и серологическим методами) ($p = 0,03$). В клиническом материале пациентов, принимавших antimicrobные препараты на догоспитальном этапе, в сравнении с теми, кто эти препараты не использовал, в сочетании с норовирусом в 2,1 раза чаще выявляли ротавирус. Ассоциации этого фактора с частотой детекции других как бактериальных, так и вирусных патогенов не выявили. При наличии проявлений синдрома колита в группе лиц с позитивной реакцией клинического материала на норовирус велика вероятность вирусно-бактериальной кишечной микст-инфекции, что подтвердили выявлением *Salmonella* spp. культуральным и ПЦР-методами, соответственно, в 7,6 и 3 раза чаще, чем у больных без колита. У больных с признаками гемоколита в сравнении с теми, у кого гемоколит не документировали, в 11 раз чаще выявляли *Salmonella* spp. именно культуральным методом ($p = 0,01$).

Ключевые слова: острая диарея, культуральный метод, ИФА-метод, ПЦР-метод, норовирус, ассоциация энтеропатогенов.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Кожухова Е.А., Горбова И.В. Характеристика случаев острой диареи у взрослых больных с позитивной реакцией клинического материала на норовирус // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 375–380.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-375-380

Citation:

Kozhukhova E.A., Gorbova I.V. Characteristics of acute diarrhea in adult patients positive for Norwalk virus // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 375–380.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-375-380

CHARACTERISTICS OF ACUTE DIARRHEA IN ADULT PATIENTS POSITIVE FOR NORWALK VIRUSKozhukhova E.A.^a, Gorbova I.V.^b^a Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^b S.P. Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Remaining unmanageable, Norwalk virus infection is clearly tended to be recorded at higher rate, including adult patients. In many cases, clinical picture of adult acute diarrhea in patients positive for Norwalk virus in clinical samples vs. pathogenetically-caused norovirus infection differs, thereby justifying comparison of clinical and laboratory data. A cohort retrospective study with 146 hospitalized adult patients suffering from acute moderate diarrhea positive for fecal Norwalk virus was performed. Along with standard laboratory tests (culturing, serologic for detecting 4-fold increase in titer between paired serum samples, ELISA), detection of diarrhea-linked agents included PCR kit Amplisens® AII-bacto-screen-FL Lab (Interlabservice). The data obtained demonstrated that in adult patients with acute diarrhea 54.1% of cases were positive for Norwalk virus as well as for other enteric pathogens, including bacteria found in 36.3% of cases. Moreover, clinical samples of patients with acute diarrhea hospitalized at least on day 4 vs. day 3 after the onset were significantly more often (by 1.5-fold) positive for association between Norwalk virus and other acute enteric infection agents mainly due to astrovirus ($p = 0.03$; PCR data) and *Shigella* spp. (culture-based and serologic methods; $p = 0.03$). In addition, Norwalk virus was associated with rotavirus, but not other enteric pathogens, at 2.1-fold higher rate in clinical samples from patients treated vs. untreated with antimicrobials before hospitalization. Finally, clinical samples positive for Norwalk virus from patients with vs. without developed colitis syndrome were at higher risk of developing virus-bacterial enteric infection detecting *Salmonella* spp. at 7.6- and 3-fold higher rate verified by culture-based and PCR assay, respectively. Importantly, patients with vs. without hemorrhagic colitis *Salmonella* spp. verified primarily a culture-based method was detected by 11-fold more frequently ($p = 0.01$).

Key words: acute diarrhea, culture method, ELISA, PCR, Norwalk virus, enteropathogen association.

Введение

Достаточно широкое внедрение молекулярно-биологических лабораторных методов диагностики внесло существенный вклад в представление об эпидемиологии острых диарей (ОД) и их современной структуре [9, 12, 22]. В настоящее время в Российской Федерации, как и в других странах, лидерами среди вирусных возбудителей острых диарей, наиболее значимыми по частоте возникновения как спорадической, так и вспышечной заболеваемости, являются ротавирусы и норовирусы [7, 8, 18, 13]. На фоне повсеместного достаточно эффективного внедрения вакцины против ротавирусной инфекции [2, 21], в отношении пока неуправляемой норовирусной инфекции имеет место отчетливая тенденция к увеличению частоты ее регистрации, в том числе в многопрофильных стационарах для взрослых [6], и к повышению летальности от нее среди детей [1]. Классическим течением норовирусной инфекции у неиммунного детского организма является гастроэнтерит [19]. У взрослых пациентов норовирусная инфекция может протекать как с выраженной диарейной симптоматикой, так и бессимптомно с длительным выделением вируса в окружающую среду и широкой его циркуляцией [14, 16].

Клиническая картина острой диареи у взрослых нередко развивается на фоне сопутствующей хронической патологии желудочно-кишечного тракта [10, 11], что может сделать ее отличной от классического патогенетически обусловленного течения инфекции [3, 4], значительно затрудняя диагностику. Кроме того, хорошо

известно, что возможны варианты острых диарей, вызванных ассоциацией различных энтеропатогенов, в том числе вирусно-бактериальных [5, 20], что может манифестироваться проявлениями, также не укладывающимися в рамки классического течения моноинфекции. Все эти обстоятельства у взрослых больных инфекционной диареей создают существенные трудности ее верификации, по результатам которой предпринимаются дальнейшие клинико-эпидемиологические шаги. В связи с этим достаточно актуальным представляется сравнительный анализ клинической симптоматики острой диареи с результатами специфического лабораторного обследования взрослого пациента из-за необходимости их корректной интерпретации с учетом возможной коморбидности, микст-инфекции, спектра использованных методов.

Цель исследования — проанализировать клинико-лабораторные характеристики госпитализированных взрослых больных острой диареей с позитивной реакцией клинического материала на норовирус, выявленной по результатам комплексного специфического обследования.

Материалы и методы

Проводили когортное ретроспективное исследование. Анализировали результаты клинико-лабораторного обследования 146 госпитализированных взрослых больных острой кишечной инфекцией (ОКИ) средней тяжести, в клиническом материале которых (фекалиях) выявляли генетический маркер возбудителя норовирусной инфекции. Комплексное специфиче-

ческое лабораторное обследование включало культуральный метод для выявления *Salmonella* spp. (с использованием сред обогачения), *Shigella* spp., *E. coli*, серологический метод (на основе определения специфических антител в диагностическом титре или при его 4-кратном приросте) — для выявления *Salmonella* spp., *Shigella* spp., иммуноферментный метод для выявления антигенов рота- и аденовирусов, а также ПЦР-метод (исследование фекалий) с помощью набора «Амплиценс®ОКИ скрин-FL» (Интерлабсервис, Россия) для выявления генетических маркеров *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli*, рота-, астро-, адено- и Norwalk вирусов.

Анализ полученных результатов проводили параметрическими и непараметрическими методами с помощью пакета программ SAS. Применяли элементы многофакторного дисперсионного анализа. Частотные характеристики сравнивали с использованием таблиц сопряженности, критерия независимости χ^2 и точного критерия Фишера. Оценивали относительные риски с учетом значений доверительных интервалов.

Критический уровень значимости p при проведении исследования считали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

В когорте обследованных больных несколько преобладали женщины (61%). Лица 60 лет и старше составили 9,6%. В целом сопутствующая неинфекционная патология имела место более чем у половины (55,5%) больных, сопутствующая хроническая патология желудочно-кишечного тракта — у 32,4% пациентов. В стационар больные поступали преимущественно на 1–3 дни заболевания, хотя почти у $1/5$ части пациентов документированы достаточно поздние сроки госпитализации — на 4 день болезни и позднее (табл. 1).

Каждый пятый (21% больных) пациент указал на факт приема антимикробных препаратов (АМП) на догоспитальном этапе.

Анализ клинических проявлений показал, что наряду с симптоматикой гастроэнтерита, более чем у четверти больных (28,4%) документировали проявления колитического синдрома, патогенетически не свойственного норовирусной инфекции [15, 17].

Результаты детекции энтеропатогенов всеми использованными лабораторными методами представлены в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, норовирус в качестве единственного возбудителя был обнаружен только у 45,9% пациентов. В остальных 54,1% случаев выявляли различные ассоциации норовируса с другими возбудителями, в том числе с бактериальными — более чем у трети больных (53 человека, 36,3%). Среди последних у 67,9% пациентов бактериальный патоген наряду с норовирусом был выявлен только методом

ПЦР. У остальных 17 из 53 больных (32,1%) — одновременно ПЦР и культуральными методами.

У пациентов, поступавших на 4 день болезни и позднее (в сравнении с теми, кто поступил в первые 3 дня заболевания), значительно чаще лабораторно обнаруживали ассоциацию норовируса с другими энтеропатогенами [73,1 и 49,6%, $p = 0,032$; коэффициент корреляции (КК) 2, 2, $p = 0,03$; относительный риск (ОР): 1, 5, доверительный интервал (ДИ): 1,1–2,0]. Так, значимо чаще у поступивших в более поздние сроки выявляли ассоциацию норовируса с астровирусом (методом ПЦР) (23,1 и 8,4% у поступивших в 1–3 дня болезни, $p = 0,042$; КК 2, 2, $p = 0,031$; ОР: 2, 7, ДИ: 1,1–6,9) и норовируса с *Shigella* spp. (культуральным и серологическим методами) (7,7 и 0% соответственно, $p = 0,031$; КК 3, 1, $p = 0,002$).

Тенденция к более частой детекции *Shigella* spp. одновременно с норовирусом также имела место у лиц 60 лет и старше (в сравнении с более молодыми пациентами) (21,4 и 6,1%, $p = 0,073$), причем преимущественно за счет разницы результата при использовании именно ПЦР-метода (21,4 и 5,3%, $p = 0,057$; КК 2, 3, $p = 0,023$; ОР: 4, 0, ДИ: 1,2–13,9).

Анализ ассоциации применения антимикробных препаратов (АМП) на догоспитальном этапе и результата специфической лабораторной диагностики показал, что в клиническом материале тех, кто принимал АМП, значительно чаще наряду с норовирусом обнаруживали ротавирус (табл. 3) ($p = 0,043$). Ассоциации этого фактора с частотой детекции других как бактериальных, так и вирусных патогенов не выявили.

Сопоставление клинической симптоматики с результатами выявления возбудителей острой диареи показало, что из когорты обследованных больных у лиц с проявлениями колитического синдрома в сравнении с пациентами без них *Salmonella* spp. выявляли значительно чаще (32,5 и 10,9% соответственно, $p = 0,005$; КК 3, 2, $p = 0,002$; ОР: 3, ДИ: 1,5–6,1). Различия оказались

Таблица 1. Сроки заболевания при поступлении в стационар

Table 1. Data on disease day at the moment of hospital admittance

День болезни (д.б.) на момент госпитализации Disease day (d.d.)	N (количество пациентов) N (number of patients)	%
На 4 д.б. и позднее The 4 th d.d. and later	26	17,9
На 1–3 д.б. The 1 st – 3 rd d.d.	119	82,1
Всего/Total	145	100,0
Данные отсутствуют Missing data	1	
Всего/Total	146	

значимыми как при использовании культурального (15 и 2%, $p = 0,007$; КК 3, 1, $p = 0,002$; ОР: 7, 6, ДИ: 1,6–36,0), так и ПЦР — метода (30 и 10,9% у лиц без колита, $p = 0,01$; КК 2, 8, $p = 0,005$; ОР: 2, 8, ДИ: 1,3–5,7) специфической диагностики.

Выраженной ассоциации детекции других бактериальных и вирусных энтеропатогенов с наличием у пациентов синдрома колита не выявили.

Таблица 2. Результаты детекции возбудителей острой диареи у обследованных больных

Table 2. Results of AD agent detection in patients examined

Возбудитель Etiologic agent	N	%
Shigella spp. + норовирус <i>Shigella</i> spp. + Norwalk virus	5	3,4
Salmonella spp. + норовирус <i>Salmonella</i> spp. + Norwalk virus	15	10,3
Escherichia coli + Campylobacter spp. + норовирус <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter</i> spp. + Norwalk virus	2	1,4
Campylobacter spp. + норовирус <i>Campylobacter</i> spp. + Norwalk virus	8	5,5
Shigella spp. + норовирус + ротавирус <i>Shigella</i> spp. + Norwalk virus + Rotavirus	3	2,0
Норовирус + ротавирус + астровирус Norwalk virus + Rotavirus + Astrovirus	2	1,4
Salmonella spp. + норовирус + ротавирус <i>Salmonella</i> spp. + Norwalk virus + Rotavirus	7	4,8
Shigella spp. + норовирус + астровирус <i>Shigella</i> spp. + Norwalk virus + Astrovirus	1	0,7
Salmonella spp. + норовирус + ротавирус + астровирус <i>Salmonella</i> spp. + Norwalk virus + Rotavirus + Astrovirus	3	2,0
Escherichia coli + норовирус <i>Escherichia coli</i> + Norwalk virus	3	2,0
Escherichia coli + норовирус + ротавирус <i>Escherichia coli</i> + Norwalk virus + Rotavirus	1	0,7
Норовирус Norwalk virus	67	45,9
Campylobacter spp. + норовирус + ротавирус <i>Campylobacter</i> spp. + Norwalk virus + Rotavirus	2	1,4
Shigella spp. + Campylobacter spp. + норовирус <i>Shigella</i> spp. + <i>Campylobacter</i> spp. + Norwalk virus	2	1,4
Норовирус + астровирус Norwalk virus + Astrovirus	10	6,8
Shigella spp. + норовирус + ротавирус + астровирус <i>Shigella</i> spp. + Norwalk virus + Rotavirus + Astrovirus	1	0,7
Норовирус + ротавирус Norwalk virus + Rotavirus	14	9,6
Всего Total	146	100

Более детальный анализ клинико-лабораторных сопоставлений показал, что имела место тенденция более частой детекции бактериальных энтеропатогенов именно стандартными методами у пациентов с документированным синдромом гемоколита в сравнении с лицами без него (50 и 10%, $p = 0,063$; коэффициент корреляции 2, 5, $p = 0,013$; ОР: 4, 9, ДИ: 1,6–14,8). Более того, у больных с проявлениями гемоколита по сравнению с теми, у кого эти проявления отсутствовали, наряду с генетическим маркером норовируса в 11 раз чаще выявляли такой бактериальный энтеропатоген, как *Salmonella* spp., именно культуральным методом (табл. 4), что не противоречит патогенетическим особенностям сальмонеллезной инфекции.

Сопоставление результатов детекции бактериальных энтеропатогенов методом ПЦР с наличием проявлений гемоколита у пациентов исследуемой когорты значимой ассоциации не выявило.

Выводы

При комплексном специфическом лабораторном обследовании взрослых больных острой диареей наряду с генетическим маркером норовируса у 54,1% лиц одновременно выявляются другие энтеропатогены, в том числе бактериальные — более чем у трети пациентов (36,3%).

В клиническом материале взрослых пациентов, поступающих на 4 день острой диареи и позднее (в сравнении с теми, кто поступает в первые 3 дня болезни), значимо чаще (в 1,5 раза) выявляется ассоциация норовируса с другими возбудителями острой кишечной инфекции

Таблица 3. Прием антимикробных препаратов (АМП) на догоспитальном этапе и частота выявления ротавируса (наряду с норовирусом) у обследованных пациентов

Table 3. Antimicrobials (AMCs) administered prior to hospitalization as well as rate of rotavirus (along with Norwalk virus) detection in patients examined

Прием АМП до госпитализации Antimicrobials administered prior to hospitalization	Наличие маркера ротавируса Rotavirus markers	Всего Total		
		Да Yes	Нет No	
Да Yes	N	11	19	30
	%	36,7	63,3	100,0
Нет No	N	20	93	113
	%	17,7	82,3	100,0
Всего Total	N	31	112	143
	%	21,7	78,3	100,0

Примечание. $p = 0,043$; коэффициент корреляции Спирмена: 2,27, $p = 0,025$; ОР = 2,1, CI: 1,1–3,8.

Note. $p = 0,043$; Spearman correlation coefficient: 2.27, $p = 0.025$; OR = 2.1, CI: 1.1–3.8.

($p = 0,03$), преимущественно за счет ассоциации с астровирусом ($p = 0,04$) и с *Shigella* spp. (культуральным и серологическим методами) ($p = 0,03$).

В клиническом материале пациентов, принимающих антимикробные препараты на догоспитальном этапе, в сравнении с теми, кто эти препараты не использует, наряду с Norwalk в 2,1 раза чаще одновременно выявляется ротавирус.

У взрослых больных острой диареей с позитивной реакцией клинического материала на норовирус при наличии синдрома колита велика вероятность вирусно-бактериальной кишечной микст-инфекции, что подтверждается выявлением *Salmonella* spp. культуральным и ПЦР-методами, соответственно, в 7,6 и 3 раза чаще, чем у больных без колита. У больных с признаками гемоколита в сравнении с теми, у кого гемоколит не документируют, в 11 раз чаще выявляют *Salmonella* spp. именно культуральным методом ($p = 0,01$).

Таблица 4. Наличие синдрома гемоколита и результаты высева *Salmonella* spp. в когорте обследованных больных

Table 4. Hemorrhagic colitis and *Salmonella* spp. detected by culture-based method in patient cohort

Гемоколит Hemorrhagic colitis		<i>Salmonella</i> spp. inoculum		Всего Total
		Да Yes	Нет No	
Есть Yes	N	2	2	4
	%	50,0	50,0	100,0
Нет No	N	6	132	138
	%	4,3	95,7	100,0
Всего Total	N		134	142
	%		94,4	100,0

Примечание. $p = 0,016$; коэффициент корреляции Спирмена: 4,1, $p = 0,000$; OR = 11,5, CI: 3,3–40,3.

Note. $p = 0.016$; Spearman correlation coefficient: 4.1, $p = 0.000$; OR = 11.5, CI: 3.3–40.3.

Список литературы/References

- Боднев С.А., Малеев В.В., Жираковская Е.В., Юн Т.Э., Тикунов А.Ю., Никифорова Н.А., Корсакова Т.Г., Клемешева В.В., Качко А.В., Подколзин А.Т., Тикунова Н.В. Норовирусы как этиологический фактор острых кишечных инфекций у детей раннего возраста в Новосибирске // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010. № 1. С. 40–44. [Bodnev S.A., Maleev V.V., Zhirakovskaya Ye.V., Yun T.E., Tikunov A.Yu., Nikiforova N.A., Korsakova T.G., Klemesheva V.V., Kachko A.V., Podkolzin A.T., Tikunova N.V. Noroviruses as an etiological factor of acute enteric infections in Novosibirsk infants. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2010, no. 1, pp. 40–44. (In Russ.)]
- Ермоленко К.Д., Лобзин Ю.В., Гончар Н.В. Вирусные гастроэнтериты у детей: современные представления об эпидемиологии и профилактике // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7. С. 22–32. [Ermolenko K.D., Lobzin Yu.V., Gonchar N.V. Viral gastroenteritis in children: modern concepts of epidemiology and prevention. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, vol. 7, pp. 22–32. doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-3-22-32 (In Russ.)]
- Кожухова Е.А., Иващенко В.Д., Горбова И.В. Детекция энтеропатогенов для верификации острых диарей у взрослых больных // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. 2013. Т. 20, № 2. С. 62–66. [Kozhukhova E.A., Ivaschenko V.D., Gorbova I.V. Enteropathogene detection for verification of adult acute diarrhea cases. *Uchenye zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta imeni akademika I.P. Pavlova = The Scientific Notes of the I. P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*, 2013, no. 2, pp. 62–66. (In Russ.)]
- Любезнова О.Н., Утенкова Е.О. Ротавирусная и норовирусная инфекции у взрослых // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2017. Т. 12. С. 32–35. [Lyubeznova O.N., Utenkova E.O. Rotavirus and norovirus infection in adult. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of the North Caucasus*, 2017, vol. 12, pp. 32–35. (In Russ.)]
- Полянская Н.А., Лобова Е.Ф., Мунаева Ш.Д., Забара В.И., Елистратова Г.А. Клинико-лабораторная характеристика и катамнестическое наблюдение за детьми с микст-вариантом ротавирусной инфекции // Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. 20, № 2. С. 146–149. [Polyanskaya N.A., Lobova E.F., Munaeva Sh.D., Zabara V.I., Elistratova G.A. Clinical and laboratory characteristics and catamnestic observation after the children with mixed-version of rotaviral infection. *Vestnik novykh medicinskih tehnologij = Journal of New Medical Technologies*, 2013, vol. 20, no. 2, pp. 146–149. (In Russ.)]
- Сагалова О.И., Брызгалова И.В., Подколзин А.Т., Малеев В.В. Норовирусная инфекция в многопрофильных стационарах для взрослых // Терапевтический архив. 2009. Т. 81, № 4. С. 60–63. [Sagalova O.I., Bryzgalova I.V., Podkolzin A.T., Maleev V.V. Norovirus infection in general hospitals for adults. *Terapevticheskij arhiv = Therapeutic archive*, 2009, vol. 81, no. 4, pp. 60–63. (In Russ.)]
- Сагалова О.И., Пищулова О.А., Нечет В.А., Подколзин А.Т., Малеев В.В., Абрамычева Н.Ю., Фенске Е.Б. Характеристика этиологической структуры острых кишечных инфекций у взрослых по данным инфекционного стационара // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2007. № 5. С. 7–12. [Sagalova O.I., Pishchulova O.A., Nechet V.A., Podkolzin A.T., Maleev V.V., Abramychcheva E.Yu., Fenske E.B. Characteristic of the etiologic structure of acute enteric infections in adults based on the data from infectious diseases hospital. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2007, no. 5, pp. 7–12. (In Russ.)]
- Семена А.В., Малышев В.В., Финогеев Ю.П., Мясников И.О., Макаров Д.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика вспышки острых кишечных диарейных инфекций // Журнал инфектологии. 2009. Т. 1, № 2–3. С. 48–51. [Semena A.V., Malyshev V.V., Finogeev Yu.P., Myasnikov I.O., Makarov D.A. Clinical and epidemiological characteristics of outbreaks of acute intestinal diarrheal infections. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2009, vol. 1, no. 2–3, pp. 48–51. doi: 10.22625/2072-6732-2009-1-2,3-48-51 (In Russ.)]
- Сергеева А.В., Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Благодравова А.С., Епифанова Н.В., Сашина Т.Д., Морозова О.В., Новикова Н.А. Молекулярно-генетический мониторинг острых кишечных инфекций вирусной этиологии в детском

- многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 243–252. [Sergeeva A.V., Poslova L.Yu., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Epifanova N.V., Sashina T.D., Morozova O.V., Novikova N.A. Viral etiology acute intestinal infections molecular monitoring in children's hospital. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 243–252. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-243-252 (In Russ.)]
10. Цинзерлинг В.А., Белинская Е.И., Свистунов В.В. Клинико-морфологические подходы к дифференциальной диагностике дифтеритических колитов // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7, № 2. С. 5–13. [Tsinslerling V.A., Belinskaya E.I., Svistunov V.V. Clinical and morphological approaches to the differential diagnosis of diphtheric colitis. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, vol. 7, no. 2, pp. 5–13. doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-2-5-13 (In Russ.)]
 11. Ющук Н.Д., Розенблюм А.Ю., Пархоменко Ю.Г., Ефремова Л.В., Тишкевич О.А., Карманов М.И., Каншина Н.Н., Буров В.П., Бергман Г.А. Клинико-морфологические особенности шигеллеза Флекснера у больных с отягощенным преморбидным фоном // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2002. № 2. С. 77–79. [Iushchuk N.D., Rozenblium A.Yu., Parkhomenko I.G., Efremova L.V., Tishkevich O.A., Karmanov M.I., Kanshina N.N., Burov V.P., Bergman G.A. Clinical and morphological aspects of shigellosis Flexneri in patients with an aggravated premorbid state. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2002, no. 2, pp. 77–79. (In Russ.)]
 12. Яковлев А.А., Мусатов В.Б., Котлярова С.И., Неверов В.А., Кинго З.Н., Федуняк И.П., Лукашевич Э.Н. Возможности высокотехнологичной идентификации возбудителей острых кишечных инфекций в Санкт-Петербурге // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. 2010. Т. 2, № 3. С. 5–8. [Yakovlev A.A., Musatov V.B., Kotlyarova S.I., Neverov V.A., Kingo Z.N., Fedunyak I.P., Lukashevich E.N. Features high-tech identification of pathogens acute intestinal infections in St. Petersburg. *Vestnik Sankt-Peterburgskoj medicinskoj akademii posleddiplomnogo obrazovaniya = Bulletin of Saint Petersburg Medical Academy for Postgraduate Education*, 2010, no. 3, pp. 5–8. (In Russ.)]
 13. Ajami N.J., Koo H.L., Darkoh C., Atmar R.L., Jiang Z.D., DuPont H.L. Characterization of Norovirus-associated travelers' diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 51, no. 2, pp. 123–130.
 14. Bisseux M., Colombet J., Mirand A., Roque-Afonso A.-M., Abravanel F., Izopet J., Archimbaud C., Peigue-Lafeuille H., Debroas D., Bailly J.-L., Henquell C. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Euro Surveill.*, 2018, vol. 23, no. 7. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237
 15. Blutt S.E., Conner M.E. The gastrointestinal frontier: IgA and viruses. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 4, p. 402. doi: 10.3389/fimmu.2013.00402
 16. Bok K., Green K.Y. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *New Engl. J. Med.*, 2013, vol. 368, no. 10, p. 971. doi: 10.1056/NEJMc1301022
 17. Desai D., Faubion W.A., Sandborn W.J. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacol. Ther.*, 2007, vol. 25, iss. 3, pp. 247–255.
 18. Di Bartolo I., Pavoni E., Tofani S., Consoli M., Galuppini E., Losio M.N. Waterborne norovirus outbreak during a summer excursion in Northern Italy. *New Microbiol.*, 2015, vol. 38, no. 1, pp. 109–112.
 19. Koo H.L., Ajami N., Atmar R.L., DuPont H.L. Noroviruses: the leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov. Med.*, 2010, vol. 10, no. 50, pp. 61–70.
 20. Nitzan O., Elias M., Chazan B., Raz R., Saliba W. Clostridium difficile and inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and implications in treatment. *World J. Gastroenterol.*, 2013, vol. 19, no. 43, pp. 7577–7585. doi:10.3748/wjg.v19.i43.7577
 21. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Steele A.D., Duque J., Parashar U.D. 2008 estimate of world wide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 136–141. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70253-5
 22. Van Alphen L.B., Dorléans F., Schultz A.C., Fonager J., Ethelberg S., Dalgaard C. The application of new molecular methods in the investigation of a waterborne outbreak of norovirus in Denmark, 2012. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 9: e105053. doi: 10.1371/journal.pone.0105053

Авторы:

Кожухова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций НИЦ при кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Горбова И.В., зав. клинико-диагностической лабораторией ФГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kozhukhova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Chronic Viral Infection Laboratory of the Research Center (Branch of the Infectious Diseases and Epidemiology Department), Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Gorbova I.V., Head of the Clinical Diagnostics Laboratory, S.P. Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.05.2018
Отправлена на доработку 22.03.2019
Принята к печати 05.04.2019

Received 11.05.2018
Revision received 22.03.2019
Accepted 05.04.2019

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА Е, В ПОПУЛЯЦИИ

Н.А. Контаров^{1,2}, Н.В. Юминова², Г.И. Алаторцева², Л.Н. Лухверчик^{2,3},
З.Ш. Нурматов³, И.В. Погарская²

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

² ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ НПО «Профилактическая медицина», Москва, Россия

Резюме. Гепатит Е — острое вирусное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, которое характеризуется преимущественно водным путем передачи, циклической вспышечной заболеваемостью и частым развитием острой печеночной энцефалопатии у беременных. Эпидемиологические вспышки возникают в странах Центральной Азии, Африки и Латинской Америки. К эндемичным странам относят Китай, Индию, Туркмению, Казахстан, Таджикистан, Узбекистан, Кыргызстан, Боливию, Мексику, Тайвань. Доля гепатита Е в структуре острых вирусных гепатитов во время вспышек колеблется от 64,7 до 80%, в условиях спорадической заболеваемости — от 10 до 18,8%. Доля гепатита Е в структуре острых вирусных гепатитов колеблется от 0,5 до 12,6% в европейских странах и на отдельных территориях РФ. Подтверждена скрытая активная циркуляция вируса в ряде регионов РФ. Все завозные случаи связаны с недавним посещением заболевшими регионов с высокой заболеваемостью гепатитом Е. При этом заболевание клинически ничем не отличалось от типичной инфекции, вызванной вирусом гепатита Е, но у контактировавших лиц случаев инфицирования не наблюдалось. Отсутствие контактной передачи в этом случае связывают с низкой выживаемостью вируса вне организма. Источником инфекции являются больные с любой формой заболевания, в том числе и безжелтушной. Повышенный риск инфицирования вирусом гепатита Е характерен для работников животноводческих хозяйств, осуществляющих уход за свиньями, сотрудников предприятий мясоперерабатывающей промышленности, занятых первичной обработкой туш и работающих в убойных цехах. ВОЗ сообщает о 20 млн случаев инфицирования вирусом гепатита Е, 3 млн острых случаев гепатита Е, 70 000 летальных случаев в год. Среди причин смерти от гепатита Е на первом месте находится хроническая патология печени — до 70%, затем гибель беременных — до 40% и на последнем месте — острая печеночная и почечная недостаточность — до 4%. Разработка математической модели развития инфекции, вызванной вирусом гепатита Е позволила бы осуществлять прогноз изменения заболеваемости данной инфекцией на контролируемой территории. В работе впервые продемонстрирована математическая модель развития гепатита Е в популяции с учетом формы заболевания. С помощью данной модели возможно осуществлять прогноз числа заболевших наиболее опасной желтушной формой гепатита Е и числа восприимчивых к данной инфекции в период подъема заболеваемости на данной территории.

Ключевые слова: гепатит Е, желтушная форма гепатита Е, безжелтушная форма гепатита Е, математическая модель, время удвоения инфекции, передаточное число, популяция.

Адрес для переписки:

Контаров Николай Александрович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 674-01-99.
E-mail: kontarov@mail.ru

Contacts:

Nikolay A. Kontarov
105064, Russia, Moscow, Small Kazenny Lane, 5a,
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-01-99
E-mail: kontarov@mail.ru

Библиографическое описание:

Контаров Н.А., Юминова Н.В., Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н.,
Нурматов З.Ш., Погарская И.В. Математическая модель развития
инфекции, вызванной вирусом гепатита Е, в популяции // Инфекция
и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 381–384. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-381-384

Citation:

Kontarov N.A., Yuminova N.V., Alatorceva G.I., Luchverchik L.N.,
Nurmatov Z.Sh., Pogarskaya I.V. A mathematical model for developing
hepatitis E virus infection in human population // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2,
pp. 381–384. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-381-384

A MATHEMATICAL MODEL FOR DEVELOPING HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN HUMAN POPULATION

Kontarov N.A.^{a,b}, Yuminova N.V.^b, Alatorseva G.V.^b, Lukhverchik L.N.^b, Nurmatov Z.Sh.^c, Pogarskaya I.V.^b

^a I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

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

^c SPS "Preventive Medicine", Moscow, Russian Federation

Abstract. Hepatitis E is an acute viral infectious disease transmitted by fecal-oral route mainly through fecally contaminated drinking water, with cyclic outbreaks and frequent development of acute hepatic encephalopathy in pregnant women. Hepatitis E epidemic outbreaks occur in Central Asia, Africa and Latin America, whereas China, India, Turkmenistan, Kazakhstan, Tajikistan, Uzbekistan, Kyrgyzstan, Bolivia, Mexico, and Taiwan represent endemic geographic regions. Hepatitis E in the structure of acute viral hepatitis morbidity during outbreaks ranges from 64.7% to 80%, whereas sporadic morbidity may be up to 10 to 18.8%. In contrast, percentage of hepatitis E in acute viral hepatitis varies from 0.5% to 12.6% in European countries and some territories of the Russian Federation. The latent active virus circulation was confirmed in various regions of the Russian Federation. All introduced cases were related to recent traveling to the regions with high incidence of hepatitis E, which course clinically did not differ from standard hepatitis E infection, but no cases of infection were recorded after exposure. Lack of contact transmission in this case was associated with low virus survival in environment. Patients with any clinical form including anicteric serve as a source of infection. An increased risk of hepatitis E infection is typical for livestock workers dealing with pigs, employees of meat processing plants engaged in primary meat carcass processing and working at slaughterhouse. According to the World Health Organization, 20 million cases of hepatitis E virus infection are recorded annually, among which 3 million cases account for acute hepatitis E and related 70 000 lethal outcomes. Chronic liver disorders comprising up to 70% followed by death of pregnant women (40%) as well as acute liver and kidney failure reaching as low as 4% result in lethal outcome in hepatitis E patients. Creating a mathematical model for development of hepatitis E infection could allow to predict changes in its morbidity rate at controlled area. Here, for the first time we propose a mathematical model for developing hepatitis E in human population based on disease course, which may potentially predict an incidence rate for the most dangerous icteric hepatitis E as well as assess amount of individuals susceptible to it at morbidity rise in the geographic region.

Key words: hepatitis E virus, icteric and anicteric hepatitis, mathematical model, infection doubling time, transmission number, population.

Введение

Гепатит E является распространенным заболеванием в бедных странах и странах с низким уровнем гигиены [3]. Имеются две формы протекания данной инфекции: наиболее опасная желтушная и безжелтушная. Наиболее опасной данная инфекция является для беременных, в следствие высокой степени вертикальной трансмиссии [1, 2, 4]. При этом в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют количественные данные о динамике изменения желтушных форм, их соотношении с восприимчивыми членами популяции и инфицированными безжелтушными формами. В этой связи предпринята попытка восполнить указанный пробел посредством применения математического моделирования.

Материалы и методы

В полученной нами математической модели рассматривается развитие двух форм гепатита E — желтушной и безжелтушной — после незначительного общего инкубационного периода. Пусть $X(t)$, $Y(t)$, $A(t)$ и $Z(t)$ обозначают численности, соответственно, восприимчивых, инфици-

цированных, членов популяции с желтушной формой и членов популяции с безжелтушной формой из общей популяции N , занимающей ограниченную территорию. Предположим, что восприимчивые умирают естественной смертью со скоростью μ ; больные желтушной формой умирают от инфекции со скоростью d : $1/d$ имеет порядок дней. Составим систему дифференциальных уравнений, описывающих схему заболевания:

$$\frac{dX}{dt} = B - \mu X - \lambda cX, \lambda = \frac{\beta Y}{N}, \quad (1)$$

$$\frac{dY}{dt} = \lambda cX - (v + \mu)Y, \quad (2)$$

$$\frac{dA}{dt} = pvY - (d + \mu)A, \quad (3)$$

$$\frac{dZ}{dt} = (1 - p)vY - \mu Z, \quad (4)$$

$$N(t) = X(t) + Y(t) + Z(t) + A(t), \quad (5)$$

где B — скорость пополнения восприимчивых, μ — скорость естественной смерти, не связанной с болезнью, β — вероятность получения инфекции от случайного члена популяции, c — количество контактов, d — скорость гибели, вызванной желтушной формой, p — доля членов

популяции с желтушной формой, v — скорость превращения заболевания в желтушную форму, $1/v = D$ — средний инкубационный период стадии болезни до разделения на две возможных формы. Общая численность популяции при этом непостоянна и может быть получена при сложении уравнений (1–5):

$$\frac{dN}{dt} = B - \mu N - dA.$$

Результаты и обсуждение

Рассмотрим решение уравнений системы с учетом допущений, сделанных при составлении модели, и введем численные значения параметров модели. Если $X \approx N$, тогда Y аппроксимируется следующим выражением:

$$Y(t) = Y(0)e^{v(R_0-1)t} = Y(0)e^{rt}, \tag{6}$$

где R_0 — базовое «передаточное» число, $1/v$ — средний инкубационный период, $Y(0)$ — первоначальное количество заразных людей в популяции. Действительная скорость роста r положительная, если имеет место эпидемия ($R_0 > 1$), $R = \beta c/v$. Из (6) мы можем получить время удвоения числа жертв эпидемии:

$$t_{0.5} = \frac{\ln 2}{v(R_0-1)}. \tag{7}$$

Видно, чем больше «передаточное число», тем короче время удвоения $t_{0.5}$.

Если теперь подставить уравнение (6) в уравнение (3) для больных желтушной формой, получим:

$$\frac{dA}{dt} = pvY(0)e^{rt} - (d + \mu)A. \tag{8}$$

Вначале вспышки заболевания число заболевших с желтушной формой равно 0, то есть $A(0) = 0$, следовательно, решение уравнения (8) выглядит следующим образом:

$$A(t) = pvY(0) \frac{e^{rt} - e^{-(\mu+d)t}}{r+d+\mu}. \tag{9}$$

Оценка r для $c = 2, = 0,0000025$ и $v = 0,03$ следующая: $r = v(R_0 - 1) = -0,03$, что также указывает на отсутствие эпидемии.

Также сделаны оценки других параметров модели: $d \approx \mu = 0,03$ день⁻¹, $p = 0,7$, $v = 0,03$ день⁻¹, $c = 2$ контакта в день, B в результате можно сделать прогностическую оценку числа инфицированных $A(t)$ с желтушной формой и построить зависимость $A(t)$ в зависимости от различных значений, указанных выше параметров модели (рис. 1).

Из полученной зависимости видно увеличение числа инфицированных желтушной фор-

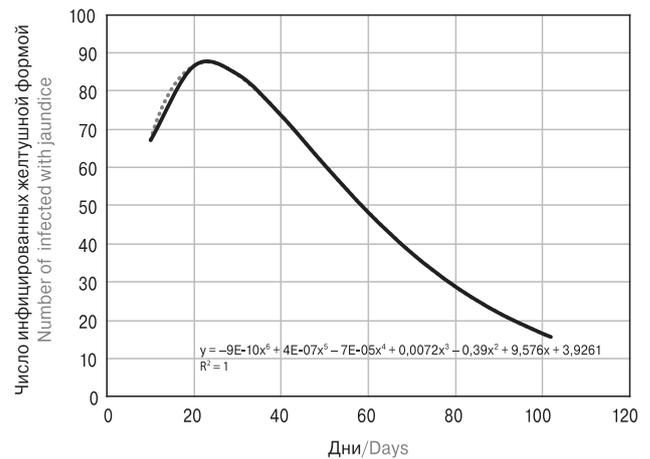


Рисунок 1. Зависимость числа заболевших желтушной формой от времени

Figure 1. A time-dependent relation for incidence of icteric hepatitis E

мой до определенного максимума и затем довольно быстрое снижение, то есть желтушная форма инфекции должна проявляться сразу после инкубационного периода или во время него. С помощью данной зависимости можно осуществлять прогноз числа заболевших наиболее опасной желтушной формой гепатита E на контролируемой территории. С помощью указанного на графике аппроксимирующего уравнения возможно определение точного числа инфицированных желтушной формой в соответствующий день от выявления данной формы инфекции.

Также представляется интересным исследование изменения стационарного числа восприимчивых X от стационарного числа инфицированных желтушной формой гепатита A и числа стационарного восприимчивых X от стационарного числа инфицированных безжелтушной формой:

$$X = \frac{(v + \mu)N}{c\beta}, \tag{10}$$

$$Z = \frac{(1 - p)(d + \mu)(B - \mu N)}{pdv}, \tag{11}$$

$$A = \frac{B - \mu N}{d}. \tag{12}$$

При численном моделировании принимались следующие параметры модели в приближении популяции города-миллионника с учетом того, что инфекция передается по фекально-оральному механизму и источником инфекции являются небольшие организованные коллективы с $N = 1000$ человек: c изменялось от 2,0 до 4,0 контактов в день с шагом 0,5; $\beta = 0,0000025$; $v = 0,03$ день⁻¹; $d \approx \mu = 0,03$ день⁻¹, $p = 0,7$; B изменялось от 355 до 405 с шагом 10 человек.

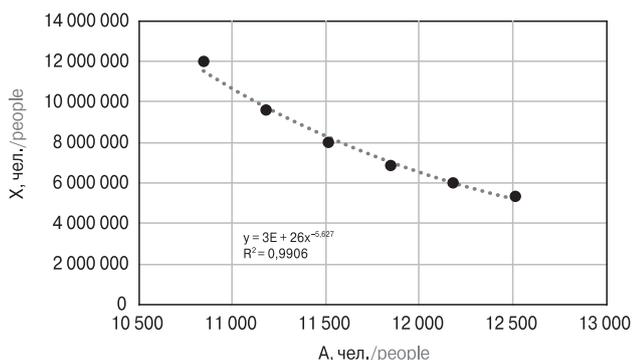


Рисунок 2. Зависимость числа восприимчивых от числа инфицированных с желтушной формой
Figure 2. A susceptible-to-infected relation for icteric hepatitis E

В результате численного эксперимента были получены зависимости гиперболического типа, представленные на рисунках 2 и 3.

Из полученных результатов видно различие числа инфицированных желтушной формой в сравнении с безжелтушной: заболевших желтушной формой больше, при этом число восприимчивых в обоих случаях уменьшается с увеличением числа инфицированных жел-

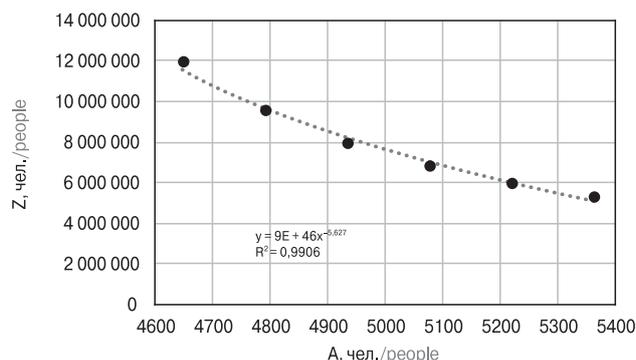


Рисунок 3. Зависимость числа восприимчивых от числа инфицированных с безжелтушной формой
Figure 3. A susceptible-to-infected relation for anicteric hepatitis E

тушной и безжелтушной формами по гиперболическому закону.

С помощью полученной математической модели можно проводить прогноз динамики изменения числа заболевших желтушной формой, оценивать уменьшение числа восприимчивых членов популяции в период увеличения заболеваемости гепатитом E и увеличение членов популяции с желтушной и безжелтушной формами.

Список литературы/References

1. Khuroo M.S., Kamili S., Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*, 1995, vol. 345, pp. 1025–1026.
2. Khuroo M.S., Kamili S., Khuroo N.S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral Hep.*, 2009, vol. 16, pp. 519–523. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01101.x
3. Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Hepatitis E: discovery, global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol.*, 2016, vol. 22, no. 31, pp. 7030–7045. doi: 10.3748/wjg.v22.i31.7030
4. Singh S., Mohanty A., Joshi Y.K., Deka D., Mohanty S., Panda S.K. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J. Pediatr.*, 2003, vol. 70, pp. 37–39.

Авторы:

Контаров Н.А., к.б.н., доцент кафедры медицинской и биологической физики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Юминова Н.В., д.б.н., зам. директора по науке, зав. лабораторией детских вирусных инфекций ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Алаторцева Г.И., к.б.н., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Лухверчик Л.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Нурматов З.Ш., к.м.н., руководитель Республиканского научно-практического центра по контролю вирусных инфекций НПО «Профилактическая медицина», г. Бишкек, Киргизская Республика;
Погарская И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Kontarov N.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Yuminova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director for Science, Head of the Laboratory of Childhood Viral Infections, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Alatortseva G.I., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Viral Genome Cloning, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Lukhverchik L.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Genome Cloning, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Nurmatov Z.Sh., PhD (Medicine), Head of the Republican Scientific and Practical Center on Surveillance for Viral Infections SPS “Preventive Medicine”, Bishkek, Kyrgyz Republic;
Pogarskyia I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.05.2018
Отправлена на доработку 26.03.2019
Принята к печати 29.04.2019

Received 05.05.2018
Revision received 26.03.2019
Accepted 29.04.2019

КОГЕРЕНТНАЯ ФЛУКТУАЦИОННАЯ НЕФЕЛОМЕТРИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

А.С. Гурьев^{1,2}, О.Ю. Шалатова³, Е.В. Русанова¹, И.А. Василенко¹, А.Ю. Волков²

¹ ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

² ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В статье представлены данные по использованию метода когерентной флукуационной нефелометрии (КФН) в клинической микробиологической практике. Это новый оптический метод, позволяющий регистрировать рост микроорганизмов, начиная с низкой концентрации 5×10^3 КОЕ/мл. Метод дает возможность конструировать технически простые и надежные многоканальные анализаторы и использовать одноразовые кюветы низкого оптического качества, что имеет важное значение для удешевления анализов. КФН-анализатор позволяет решать ряд задач в клинической лабораторной диагностике — проводить быстрый скрининг биологических жидкостей и тест на чувствительность к антибактериальным препаратам. В работе представлены данные по применению прототипа КФН-анализатора для решения двух задач — скрининга мочи на бактериурию за 2–4 ч и определению чувствительность бактериальных культур к антибиотикам за 3–6 ч. Для подтверждения эффективности метода в общей сложности исследовано более 650 образцов мочи взрослых и детей в четырех лабораториях клинической микробиологии. Сравнивали результаты, полученные традиционными методами, при помощи КФН-анализатора и анализатора мочи UF-1000i (Sysmex). Показана полезность КФН-анализатора для предварительного отбора проб на анализ: метод позволяет быстро разделять отрицательные и положительные образцы, снижая общее количество исследований на 70–80%. В отличие от аналогов, КФН-анализатор позволяет одновременно исследовать кривые роста микроорганизмов, содержащихся в моче, и их начальную концентрацию; это дает возможность достигнуть высоких показателей чувствительности и специфичности (95,2 и 96,9% соответственно). Также проведено более 250 исследований чувствительности к антибиотикам бактериальных культур в двух лабораториях. Сравнивали результаты, полученные методом серийных разведений, диско-диффузионным методом и при помощи КФН-анализатора. Продемонстрирована эффективность КФН-анализатора для быстрого определения резистентных свойств как чистых клинических культур, так и микрофлоры мочи без выделения изолятов после быстрого подрашивания на КФН-анализаторе. Совпадение результатов с традиционными методами составило от 84 до 88%. Использование КФН-анализатора совместно с экспресс-методами видовой идентификации микроорганизмов (хромогенными питательными средами или масс-спектрометрическим методом) позволит проводить полный анализ мочи за 1–2 дня. В перспективе КФН-анализатор даст возможность проводить скрининг различных биологических жидкостей человека, а также найдет применение для решения широкого круга микробиологических задач, в том числе для ускорения и стандартизации санитарно-биологических исследований.

Ключевые слова: когерентная флукуационная нефелометрия, бактериурия, скрининг, моча, определение чувствительности к антибиотикам, микробиологический анализатор.

Адрес для переписки:

Гурьев Александр Сергеевич
129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 1,
ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.
Тел.: 8 (906) 062-06-73.
E-mail: coherneph@mail.ru

Contacts:

Alexander S. Gur'ev
129110, Russian Federation, Moscow, Shchepkina str., 61/2,
M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute
(MONIKI).
Phone: +7 (906) 062-06-73.
E-mail: coherneph@mail.ru

Библиографическое описание:

Гурьев А.С., Шалатова О.Ю., Русанова Е.В., Василенко И.А., Волков А.Ю.
Когерентная флукуационная нефелометрия в клинической
микробиологии // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 385–392.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-385-392

Citation:

Gur'ev A.S., Shalotova O.Yu., Rusanova E.V., Vasilenko I.A., Volkov A.Yu.
Coherent fluctuation nephelometry in clinical microbiology // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2,
pp. 385–392. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-385-392

COHERENT FLUCTUATION NEPHELOMETRY IN CLINICAL MICROBIOLOGY

Gur'ev A.S.^{a,b}, Shalatoва O.Yu.^c, Rusanova E.V.^a, Vasilenko I.A.^a, Volkov A.Yu.^b

^a *Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation*

^b *Medtechnopark Ltd, Moscow, Russian Federation*

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

Abstract. In this article data, concerning coherent fluctuation nephelometry (CFN) use in clinical microbiology is presented. CFN is a new optical method allowing to detect bacterial growth starting from low concentration 5×10^3 CFU/ml. Method also allows to construct technically simple and reliable analyzers and to use disposable cuvettes of low optical quality, which is important for reducing the cost of analyses. CFN-analyzer allows to solve several problems in clinical laboratory diagnostics — fast screening of biological liquids and antibiotic susceptibility test. In this work data concerning CFN-analyzer prototype using for solving two problems are presented, namely fast urine screening for bacteriuria within 2–4 hours and antibiotic susceptibility testing within 3–6 hours. Altogether more than 650 urine samples from adults and children were tested in four laboratories of clinical microbiology to confirm method effectiveness. The result obtained using classical methods, CFN-analyzer and urine analyzer UF-1000i (Sysmex) were compared. Usefulness of CFN-analyzer for preliminary selection of samples for further analysis was shown, method allows to separate negative and positive samples rapidly, reducing the number of urine analyses by 70–80%. Unlike analogs, CFN-analyzer allows to perform simultaneous analysis of growth curves and initial concentration of microorganisms, enabling to reach high sensitivity and specificity (95.2% and 96.9% respectively). Also more than 250 antibiotic susceptibility tests were performed in two laboratories. The results obtained using serial dilutions method, disk diffusion method and CFN-analyzer were compared. The effectiveness of CFN-analyzer was shown for determination of resistant properties of both pure cultures and urine microflora without isolation of bacteria. The agreement with traditional methods was from 84% to 88%. The use of CFN-analyzer together with express methods of identification of microorganisms (chromogenic nutrient broths or mass-spectrometry) allows to make full urine analysis within 1–2 days. In the future CFN-analyzer gives an opportunity to screen different human biological liquids, and finds an application for other microbiological tasks, including standardization and speeding-up in sanitary bacteriology.

Key words: *coherent fluctuation nephelometry, bacteriuria, screening, urine antibiotic susceptibility testing, microbiology analyzer.*

Введение

Несмотря на появление новых высокочувствительных технологий в последние 20 лет, культивирование микроорганизмов на плотных питательных средах по-прежнему остается основным методом клинической микробиологии [1]. Он позволяет выявить этиологический агент заболевания и определить его отношение к антибактериальным препаратам для подбора рациональной антибиотикотерапии. Это трудоемкий процесс, требующий большого спектра расходных материалов и значительных материальных затрат. Кроме того, результат исследования получают через 1–3 суток. Регистрация динамики роста микроорганизмов позволяет ускорить получение результата до нескольких часов. Внедрение современных методик, в том числе основанных на биофотонике, способствует устранению недостатков классических методов.

Фотометрия в клинической микробиологии

Фотометрические методы, основанные на регистрации мутности суспензии микроорганизмов, позволяют регистрировать динамику их роста и оперативно решать две важнейшие задачи — обнаруживать микроорганизмы в биологическом материале и определять их резистентные свойства [6]. Такие методы отличаются простотой и экономичностью, позволяют ускорить получение результата и повысить эффективность лабораторных исследований. Пучок света проходит через кювету с жидкостью и рассеивается

содержащимися в ней клетками, что позволяет по ослаблению интенсивности прошедшего света оценивать концентрацию микроорганизмов; такой метод называется турбидиметрией (лат. *turbidus* — мутный), он был впервые описан в 1874 г. Метод широко используется в настольных лабораторных денситометрах (турбидиметрах) для оценки концентрации бактерий по МакФарланду в суспензиях в интервале концентраций 3×10^7 — 5×10^9 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на мл) [11]. Технически сложные турбидиметры могут достигать чувствительности 10^6 КОЕ/мл [9], что все равно недостаточно для регистрации низких концентраций бактерий в биологическом материале.

Для регистрации низких мутностей предпочтительно использование нефелометрии (греч. *perhele* — облако), в которой регистрируется не прошедший через кювету пучок излучения, а свет, рассеянный микроорганизмами. Метод впервые описан в 1894 г. Интересно, что широкое распространение нефелометрия получила благодаря Джозефу МакФарланду, предложившему в 1907 г. использовать ее для оценки концентрации бактерий в суспензиях и разработавшем серию стандартов мутности, носящих его имя, которые применяются до сих пор.

При использовании нефелометрии свет рассеивается не только бактериями в кювете, но также и всеми частями оптического канала прибора, и в первую очередь самой кюветой. Даже в специальных условиях, позволяющих исключить рассеяние на стенках кюветы, чувствительность ме-

тогда составляет $2,5 \times 10^4$ КОЕ/мл, что можно считать практическим пределом для традиционной нефелометрии [10]. Чувствительность лабораторных нефелометров обычно лежит в диапазоне 10^5 – 10^6 КОЕ/мл, причем для обеспечения хорошей обнаружительной способности необходимо использовать анализаторы сложного устройства и кюветы высокого качества. А поскольку в микробиологии кюветы должны быть стерильными и одноразовыми, высокое оптическое качество негативно сказывается на стоимости проводимого анализа. Другая причина недостаточной чувствительности нефелометрии при регистрации суспензии микроорганизмов состоит в том, что для уменьшения влияния паразитных засветок рассеянный свет обычно регистрируют под большими углами 30° – 90° , а бактерии большую часть света рассеивают под малыми углами, менее 10° .

Фотометрические методы позволяют не только оценивать концентрацию микроорганизмов, но также регистрировать динамику их роста. Несмотря на ограниченную чувствительность, нефелометрия используется в микробиологических анализаторах HB&L (Alifax S.p.a., Италия) и 216Dx UTI System (BacterioScan Inc, США), ориентированных на исследование обсемененности различных биологических жидкостей человека [6]. Одна из задач, которую они позволяют решить, — скрининг мочи на бактериурию с целью разделить положительные образцы (содержащие $\geq 10^4$ КОЕ/мл возбудителя и требующие дальнейшего анализа) и отрицательные (стерильные или содержащие транзитную ассоциативную флору). Поскольку в практической лабораторной диагностике 70–80% образцов мочи не дают роста, проведение такого рода исследований может иметь большое экономическое значение. Для проведения такого анализа образец мочи смешивается питательным бульоном и инкубируется при 35°C в приборе в течение 2–4 ч. Возможность разделить положительные и отрицательные образцы основана на том, что культивирование происходит непосредственно в образце мочи, к которому возбудитель уже адаптирован и начинает расти сразу, поэтому его рост обнаруживается быстро (за 2–4 ч в зависимости от порога обнаружения). В свою очередь, контаминирующим микроорганизмам требуется несколько часов на адаптацию к новой среде, и поэтому их рост наблюдается значительно позже.

Анализаторы, основанные на традиционной нефелометрии, не обладают достаточной чувствительностью, чтобы исследовать начальную концентрацию микроорганизмов в образце мочи по его мутности; они анализируют только задержку начала роста. Существуют анализаторы предназначенные для скрининга мочи по концентрации микроорганизмов (проточная цитометрия), однако они не могут регистрировать

микробный рост (UF-1000i, Sysmex, Япония). Анализаторы обоих типов полезны для предварительного отбора образцов мочи на посев [5].

Вторая задача, которую позволяют решать нефелометрические анализаторы, это быстрый тест на чувствительность к антибиотикам. Регистрация динамики роста микроорганизмов в присутствии антибиотиков позволяет быстро получить информацию об их резистентных свойствах за 3–6 ч.

Новые возможности по ускорению анализов, проводимых в лабораториях клинической микробиологии, открываются с использованием масс-спектрометрии, которая позволяет не только быстро идентифицировать чистые культуры микроорганизмов, но и определять возбудителя непосредственно в биологических жидкостях [5]. Сочетание нефелометрического анализатора и масс-спектрометра является эффективным инструментом, дающим возможность проводить полный анализ мочи и получать информацию для назначения антибиотикотерапии в день поступления биоматериала на исследование.

На рынке медицинского оборудования отсутствуют отечественные фотометрические микробиологические анализаторы. Зарубежные нефелометрические системы, несмотря на их эффективность в клинической микробиологии, используются в единичных лабораториях из-за высокой стоимости приборов и расходных материалов.

Возможности когерентной флукуационной нефелометрии

Новый отечественный нефелометрический метод (когерентная флукуационная нефелометрия — КФН) лишен многих недостатков традиционной нефелометрии. В КФН также регистрируется рассеянный микроорганизмами свет. При этом измеряется не средняя интенсивность рассеянного света, а ее флукуации во времени (которые в традиционной нефелометрии считаются помехами и игнорируются). В результате итоговый сигнал определяется только микроорганизмами, а паразитные засветки от кюветы игнорируются.

Метод КФН позволяет легко достичь чувствительности 10^4 КОЕ/мл [4], которая ограничивается мутностью самих питательных бульонов. При этом одноразовые кюветы, используемые для анализа, могут быть низкого оптического качества. Микробиологический КФН-анализатор реализован в формате простого многоканального прибора, в котором регистрация бактериального роста производится одновременно во всех кюветах, а механика, обеспечивающая подачу кювет в измерительный канал (например, типа карусель), отсутствует. Это упрощает конструкцию и повышает надежность прибора.

Целью проведенных исследований является демонстрация эффективности разработанно-

го КФН-анализатора для быстрого скрининга мочи на бактериурию и экспресс-определения чувствительности бактериальных культур к антибиотикам.

Материалы и методы

В проведенных исследованиях использованы разработанные отечественные КФН-микробиологические анализаторы (12-канальные анализаторы «КФН-12», ООО «Медтехнопарк»), рассчитанные на использование стандартных фотометрических пластиковых полумикрокювет объемом 1 мл, которые закрываются резиновыми пробками. В приборах совмещены методы КФН и турбидиметрии, что позволяет расширить динамический диапазон измеряемых концентраций бактерий до 5×10^3 — 5×10^9 КОЕ/мл.

Высокая чувствительность дает возможность проводить скрининг мочи на КФН-анализаторе двумя способами. Первый основан на исследовании кривых роста, когда анализируется время задержки роста после начала инкубации пробы в питательном бульоне. Второй способ основан на определении концентрации микроорганизмов в моче, которая оценивается по начальной мутности образца (рис. 1). Кювету со смесью

мочи и бульона (0,5 + 0,5 мл) помещают в прибор и регистрируют начальную мутность и кривые роста течение 2–4 ч в зависимости от выбранного порога чувствительности.

Для определения чувствительности бактериальной культуры к антибиотикам используется по одной или по две кюветы с антибиотиком в одной или двух концентрациях, определяемых пограничной МПК (минимальной подавляющей концентрацией) в соответствии со стандартом, используемым в данной лаборатории. Также используется одна контрольная кювета (в которой содержится суспензия бактерий в бульоне без антибиотика). Кривые роста в присутствии антибиотиков сравнивают с контрольной кривой. В случае наличия чувствительности к антибиотикам наблюдается подавление роста (рис. 2). Время анализа составляет от 3 до 6 ч для различных антибиотиков.

Результаты, полученные на КФН-анализаторе, сравнивали с результатами, полученными классическими методами, которые принимали за эталон. Для определения диагностической полезности методов рассчитывали следующие диагностические индикаторы: чувствительность, специфичность, позитивное прогностическое значение, негативное прогностическое значение,

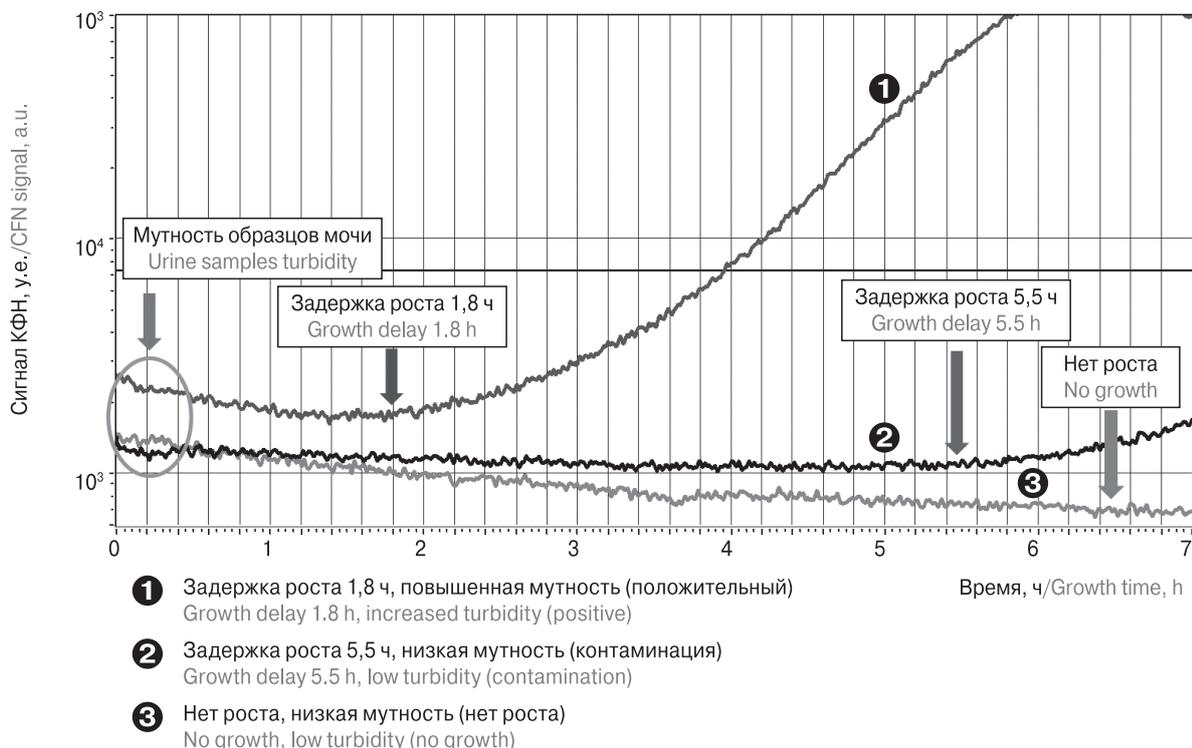


Рисунок 1. Пример кривых роста на КФН-анализаторе для трех образцов мочи — содержащего возбудитель в значимой концентрации, содержащего транзитную ассоциативную флору (посторонние загрязнения) и не содержащего микроорганизмов. Разделение положительных и отрицательных образцов проводят по двум параметрам — задержки роста и начальной мутности
 Figure 1. Representative growth curves for three urine samples in CFN-analyzer: pathogen at clinically relevant concentration, transient associated microflora (contamination), lacking microflora. Positive and negative samples were identified based on growth delay time and baseline sample turbidity

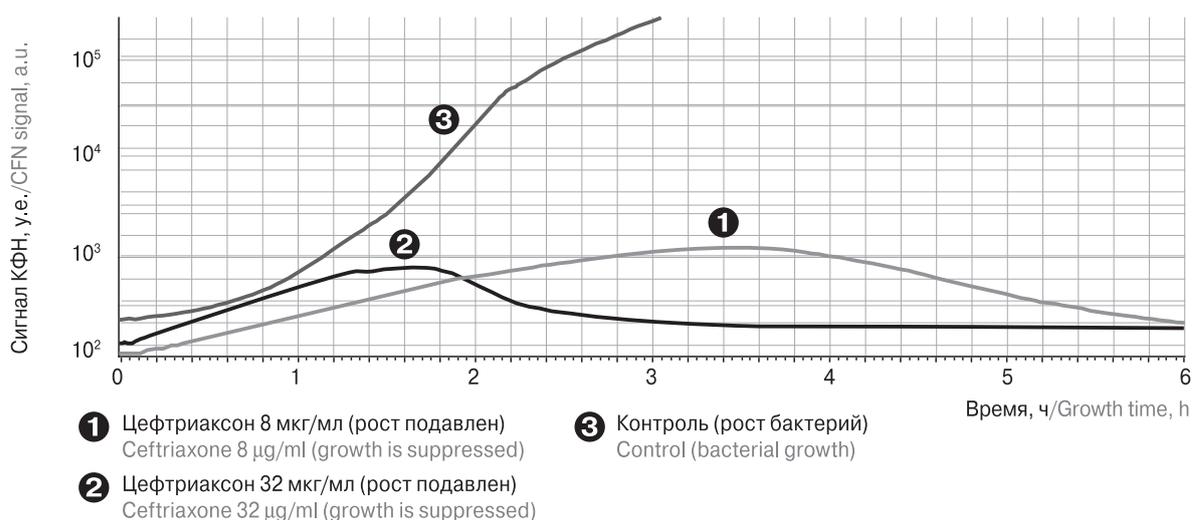


Рисунок 2. Кривые роста для чувствительного к цефтриаксону клинического изолята *E. coli* на КФН-анализаторе

Figure 2. Growth curves for ceftriaxone-sensitive *E. coli* clinical isolate in CFN-analyzer

положительное отношение правдоподобия, негативное отношение правдоподобия, диагностическое отношение шансов, а также использовали ROC-анализ [8].

Результаты и обсуждение

Опыт использования когерентной флукуационной нефелометрии для скрининга мочи

Нами исследовано более 650 образцов мочи взрослых и детей. С этой целью одновременно проводился посев на стандартные плотные питательные среды и исследование на КФН-анализаторе. Анализ образца на приборе проводили двумя способами. В первом способе анализировали задержку микробного роста, во втором — начальную концентрацию микроорганизмов в исследуемых пробах. Во всех исследованиях результаты посева на плотные среды принимали за эталон.

Скрининг 119 образцов мочи взрослых [2] показал наличие роста в 19,3% проб при посеве на плотные питательные среды. Аналогичные результаты были получены при исследовании задержки роста на КФН-анализаторе. Сравнение результатов, полученных обоими методами, показали диагностическую информативность скрининга на приборе: чувствительность — 91%, специфичность — 90%.

Скрининг 205 образцов мочи детей [3] при посеве на плотные питательные среды выявил положительный результат в 26,8% проб. Результаты анализа задержки роста на КФН-анализаторе были аналогичными; при сравнении с результатами посева, диагностическая информативность скрининга на приборе составила: чувствительность — 95%, специфичность — 85%.

При исследовании начальной концентрации микроорганизмов в 208 образцах мочи взрослых на КФН-анализаторе [2] и при параллельном посеве на плотные питательные среды выявили 31,7% положительных проб. В сопоставлении результатов, диагностическая информативность скрининга на приборе составила: чувствительность — 91%, специфичность — 46%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что КФН-анализатор является эффективным инструментом, позволяющим осуществлять предварительный отбор образцов мочи на посев, выделяя положительные образцы для дальнейшего исследования, и исключая отрицательные образцы. При этом способ исследования мочи при помощи анализа кривых роста оказался более информативным, чем способ, основанный на анализе концентрации микроорганизмов в пробе. Очевидно, что максимальная эффективность скрининга мочи может быть достигнута при одновременном анализе мутности образца и роста микроорганизмов в нем.

Валидация метода исследования на отечественном КФН-анализаторе проводилась в сравнении с зарегистрированным на отечественном рынке анализатором UF-1000i. Исследования проводились на 117 образцах мочи детей с инфекцией мочевыделительной системы [8], 18% были положительны по результатам посева на плотные среды. Результаты тестирования на КФН-анализаторе одновременно обоими способами (по кривым роста и концентрации микроорганизмов) и на UF-1000i только по концентрации микробов сравнивали с результатами посева на плотные питательные среды, которые принимали за эталон (100%). Для обоих анализаторов выбирали уровень cut-off, в соответствии с которым рассчитывали показатели диагностической

Таблица 1. Показатели диагностической информативности скрининга мочи на бактериурию на UF-1000i и КФН-анализаторе

Table 1. Parameters of diagnostic informative value bacteriuria screening by using UF-1000i and CFN-analyzer

Показатель Parameter	UF-1000i	КФН-анализатор CFN-analyzer
Чувствительность, % Sensitivity, %	95,2	95,2
Специфичность, % Specificity, %	82,3	96,9
Позитивное прогностическое значение, % Positive predictive value, %	54,1	87
Негативное прогностическое значение, % Negative predictive value, %	98,9	98,9
АUC в ROC-анализе (больше — лучше) AUC in ROC-analysis (higher values match better result)	0,949	0,987
Позитивное отношение правдоподобия (больше — лучше) Positive likelihood ratio (higher values match better result)	5,4	30,5
Негативное отношение правдоподобия (меньше — лучше) Negative likelihood ratio (lower values match better result)	0,058	0,049
Диагностическое отношение шансов (больше — лучше) Diagnostic odds ratio (higher values match better result)	43,2	81,7
Доля исключенных из дальнейшего анализа образцов, % Percentage of samples excluded from further analyses, %	68,4	80,3

информативности скрининга, чтобы достичь максимального совпадения с посевом (табл. 1).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что совместный анализ концентрации микроорганизмов и роста микрофлоры в образце мочи на КФН-анализаторе является более эффективным, чем анализ только одного из параметров.

Опыт использования когерентной флукуационной нефелометрии для определения чувствительности к антибиотикам

Для демонстрации возможности определения резистентных свойств бактерий на КФН-анализаторе выполнено 2 исследования. В общей сложности проведено более 250 определений чувствительности бактериальной культуры к конкретному антибиотику.

В первом исследовании тестировали отношение к антибиотикам 18 клинических изолятов бактерий (*E. coli* — 7 шт., *S. aureus* — 5 шт., *E. faecium* — 2 шт., *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis* — по 1 шт.) параллельно тремя методами — методом серийных разведений (МСР), диско-диффузионным методом (ДДМ) и на КФН-анализаторе [7]. Были использованы 5 антибиотиков (амоксиклав, цефепим, цефтриаксон, цефуроксим, ципрофлоксацин). Сравнение полученных результатов представлено в таблице 2.

Очевидно, что все результаты, полученные при помощи «золотого стандарта» МСР, рутинного ДДМ и на КФН-анализаторе, сравнимы, из чего можно сделать вывод о схожей диагностической информативности всех трех методов. Наилучшее совпадение результатов получено при сравнении показателей, полученных ДДМ (используемым в практическом здравоохранении) и на приборе. При этом время, необходимое для определения чувствительности к антибиотикам на КФН-анализаторе составляет 3–6 ч в сравнение с 20 ч для ДДМ, что дает воз-

Таблица 2. Соотношение результатов чувствительности к антибиотикам клинических изолятов бактерий, полученных ДДМ, МСР и на КФН-анализаторе

Table 2. Comparison of the results of clinical isolate antibiotic sensitivity obtained by disk-diffusion method (DDM), serial dilution method (SDM), and CFN-analyzer

Сравнение методов попарно Pairwise results comparison	КФН — ДДМ CFN — DDM	КФН — МСР CFN — SDM	МСР — ДДМ DDM — SDM
Совпадение, % Agreement, %	84,6	84,3	74,6
Малое расхождение, % (R — I или S — I) Minor error, % (R — I or S — I)	11,5	9,6	11,3
Несовпадение, % (R — S) Mismatch, % (R — S)	3,8	6,0	14,1
Сравнение результатов трех методов КФН — ДДМ — МСР Comparison of results obtained by the methods examined: CFN — DDM — SDM			
Совпадение, % Agreement, %	70,0	Несовпадение, % Mismatch, %	30,0

возможность получать результат непосредственно в день проведения исследования.

Возможность ускоренного скрининга резистентных свойств бактерий непосредственно в биологической жидкости без их идентификации может быть актуальным в экстренных случаях у крайне тяжелых реанимационных пациентов. Для оценки такой возможности было проведено второе исследование, в котором мы определяли чувствительность культур бактерий в образцах мочи пациентов с бактериурией после их подращивания на КФН-анализаторе (в течение 1 ч) без выделения изолятов [7]. Было исследовано 182 пробы мочи пациентов, находящихся в урологической клинике, на наличие инфекции на КФН-анализаторе (аналогично работам [2, 3]), для валидации метода использовали посев на плотные среды. Для анализа был отобран 21 положительный образец, в котором регистрировался микробный рост в течение 1 ч на приборе. Результат первичного посева на плотные среды выявил наличие роста во всех отобранных пробах (5 штаммов *E. coli*, 4 штамма *E. faecalis*, по 3 штамма *S. haemolyticus*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *A. baumannii* и 1 штамм *S. aureus*), причем в одном из образцов было высеяно 2 возбудителя. Чувствительность культур в пробе мочи, определенную на КФН-анализаторе, сравнивали с чувствительностью соответствующих изолятов, определенной ДДМ. Резистентные свойства двухкомпонентной ассоциации в пробе мочи для каждого антибиотика определялась по наиболее резистентному возбудителю. Микрофлору каждого из 21 образцов исследовали на чувствительность к 9–10 антибиотикам, всего проведено 196 исследований параллельно ДДМ и на КФН-анализаторе. Выбор набора антибиотиков определялся штаммом микроорганизма. При исследовании чувствительности микрофлоры мочи на приборе, отобранные образцы мочи использовали в качестве инокулята без выделения изолятов и типирования микроорганизмов. Всего было использовано 13 антибиотиков (амоксиклав, цефтазидим, цефтриаксон, цефоперазон, цефепим, цефазолин, имипинем, рифампицин, доксициклин, амикацин, офлоксацин, цiproфлоксацин, ванкомицин). Чувствительность, определенную на КФН-анализаторе, сравнивали с результатами исследования соответствующих изолятов при помощи ДДМ (табл. 3).

Таким образом, на КФН-анализаторе можно определять отношение к антибиотикам не только бактериальных изолятов, но микрофлоры мочи без выделения чистой культуры. При этом в случае многокомпонентной микробной ассоциации в пробе чувствительность ассоциации определяется наиболее резистентным возбудителем (в случае, если хотя бы один из возбудителей устойчив к данному антибиотику,

Таблица 3. Соотношение результатов чувствительности к антибиотикам микрофлоры мочи, полученных ДДМ и на КФН-анализаторе

Table 3. Comparison of urine microflora antibiotic susceptibility analyzed by disk-diffusion method (DDM) and CFN-analyzer

Вариант соотношения Comparison variant	%
Совпадение Agreement	87,8
Малое расхождение (R – I или S – I) Minor error (R – I or S – I)	8,2
Пропущенная чувствительность (КФН – R, ДДМ – S) Major error (missed sensitivity) (CFN – R, DDM – S)	3,6
Пропущенная резистентность (КФН – S, ДДМ – R) Very major error (missed resistance) (CFN – S, DDM – R)	0,5

то ассоциация считается устойчивой к этому антибиотику). Прибор позволяет выявлять те антибиотики, к которым чувствительны все возбудители в пробе мочи. В тандеме с MALDI-TOF масс-спектрометрией КФН-анализатор позволяет проводить полный анализ мочи за один рабочий день без изоляции чистой культуры возбудителя.

Заключение

Развитие перспективных технологий открывает новые горизонты для клинической микробиологии, однако на сегодняшний день культивирование остается ведущим методом в практической лабораторной диагностике инфекций. Для ускорения процесса регистрации роста культур применяют нефелометрические анализаторы. Исследования показали, что новый отечественный метод — когерентная флукуационная нефелометрия — позволяет проводить скрининг мочи на бактериурию и определение чувствительности к антибиотикам, обеспечивая при этом быстроту проведения исследований, максимальную диагностическую и экономическую эффективность. В тандеме с экспресс-методами видовой идентификации микроорганизмов (хромогенными питательными средами или масс-спектрометрией) метод дает возможность проводить полный анализ мочи за 1–2 дня. В перспективе КФН-анализатор даст возможность проводить скрининг различных биологических жидкостей человека, ускорить и стандартизировать санитарно-бактериологические исследования, а также анализировать бактерицидные свойства сыворотки крови для контроля за проводимой антибиотикотерапией.

Список литературы/References

1. Баранов А.А., Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Новая эпоха в медицинской микробиологии // Вестник Российской Академии наук. 2015. Т. 85, № 6. С. 907–909. [Baranov A.A., Mayanskii A.N., Chebotar' I.V., Mayanskii N.A. A new epoch in medical microbiology. *Vestnik Rossiyskoy Akademii nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, vol. 85, no. 6, pp. 515–122. doi: 10.1134/S1019331615060015 (In Russ.)]
2. Гурьев А.С., Волков А.Ю., Долгушин И.И., Поспелова А.В., Растопов С.Ф., Савочкина А.Ю., Сергиенко В.И. Когерентная флукуационная нефелометрия — быстрый метод скрининга мочи на микробную обсемененность // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 1. С. 120–123. [Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Dolgushin I.I., Pospelova A.V., Rastopov S.F., Savochkina A.Yu., Sergienko V.I. Coherent fluctuation nephelometry: a rapid method for urine screening for bacterial contamination. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 159, no. 1, pp. 107–110. doi: 10.1007/s10517-015-2902-0 (In Russ.)]
3. Гурьев А.С., Кузнецова О.Ю., Пясецкая М.Ф., Смирнова И.А., Беляева Н.А., Вербов В.Н., Волков А.Ю. Быстрый скрининг мочи на бактериурию у детей с использованием микробиологического анализатора, совмещающего в себе методы фотометрии и когерентной флукуационной нефелометрии // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 395–398. [Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Pyasetskaya M.F., Smirnova I.A., Belyaeva N.A., Verbov V.N., Volkov A.Yu. Rapid urine screening for bacteriuria in children using microbiology analyzer, combining photometric and coherent fluctuation nephelometric methods. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 395–398. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-395-398 (In Russ.)]
4. Растопов С.Ф. Когерентная флукуационная нефелометрия: высокочувствительный метод детектирования частиц в жидкости // Приборы и техника эксперимента. 2011. Т. 54, № 6. С. 95–99. [Rastopov S.F. Coherent fluctuation nephelometry: a high-sensitivity method for detecting particles in liquids. *Pribory i tekhnika eksperimenta = Instruments and Experimental Techniques*, 2011, vol. 54, no. 6, pp. 837–840. doi: 10.1134/S0020441211060194 (In Russ.)]
5. Станкевич Л.И., Герасимова Е.С., Загорельский В.В. Скрининг бактериурии с помощью автоматизированной проточной цитометрии на анализаторе UF1000i Sysmex как инструмент для отбора образцов мочи на посев // Поликлиника. 2014. Т. 4, № 1. С. 13–16. [Stankevich L.I., Gerasimova E.S., Zagorelskiy V.V. Screening of bacteriuria by an automated flow cytometry analyzer UF1000i Sysmex as an instrument for selection of urine samples for culturing. *Poliklinika = Policlinics*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 13–16 (In Russ.)]
6. Davenport M., Mach K.E., Shortliffe L.M.D., Banaei N., Wang T.H., Liao J.C. New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nat. Rev. Urol.*, 2017, vol. 14, no. 5, pp. 296–310. doi: 10.1038/nrurol.2017.20
7. Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Kraeva L.A., Rastopov S.F., Verbov V.N., Vasilenko I.A., Rusanova E.V., Volkov A.Yu. Development of microbiological analyzer based on coherent fluctuation nephelometry. In: *Advances in artificial systems for medicine and education*. Eds. Hu Z., Petoukhov S., He M. Springer, 2018, vol. 658, pp. 198–206. doi: 10.1007/978-3-319-67349-3_18
8. Gur'ev A.S., Yudina I.E., Lazareva A.V., Volkov A.Yu. Coherent fluctuation nephelometry as a promising method for diagnosis of bacteriuria. *Pract. Lab. Med.*, 2018, vol. 12: e00106. doi: 10.1016/j.plabm.2018.e00106
9. Maia M.R., Marques S., Cabrera A.R., Wallace R.J., Thompson G., Fonseca A.J., Oliveira H.M. Simple and versatile turbidimetric monitoring of bacterial growth in liquid cultures using a customized 3D printed culture tube holder and a miniaturized spectrophotometer: application to facultative and strictly anaerobic bacteria. *Front. Microbiol.*, 2016, no. 7, pp. 1381. doi: 10.3389/fmicb.2016.01381
10. U.S. EPA. Detection of biological suspensions using online detectors in a drinking water distribution system simulator. *U.S. Environmental Protection Agency*, 2010, EPA/600/R-10/005
11. Zapata A., Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr. Microbiol.*, 2015, vol. 70, no. 6, pp. 907–909. doi: 10.1007/s00284-015-0801-2

Авторы:

Гурьев А.С., PhD, старший научный сотрудник ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНКИ) им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия; научный сотрудник ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия;
Шалатова О.Ю., младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов Отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Русанова Е.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории лабораторного отдела ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, главный внештатный бактериолог МЗ МО России, Москва, Россия;
Василенко И.А., д.м.н., профессор, зав. научно-исследовательской лабораторией лабораторного отдела ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;
Волков А.Ю., к.ф.-м.н., генеральный директор ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия.

Authors:

Gur'ev A.S., PhD, Senior Researcher, Research Laboratory, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation; Researcher, Medtechnopark Ltd., Moscow, Russian Federation;
Shalatova O.Yu., Junior Researcher, Laboratory of Biopreparations, Innovative Technologies Department, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Rusanova E.V., MD, PhD, Lead Researcher, Research Laboratory, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation; Chief Supernumerary Specialist in Bacteriology, Department of Healthcare of the Moscow Region, Moscow, Russian Federation;
Vasilenko I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Laboratory, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation;
Volkov A.Yu., PhD (Physics and Mathematics), Director of Medtechnopark LTD, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.04.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 12.04.2019

Received 24.04.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 12.04.2019

РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Д.В. Уткин, М.Н. Киреев, Н.П. Гусева, Г.А. Каплун, В.Е. Куклев, Н.А. Осина

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

Резюме. Современные отечественные препараты, предназначенные для серологической диагностики чумы, направлены, как правило, на выявление в сыворотке крови антител к одному антигену. Для повышения достоверности результатов анализа целесообразно применение тест-систем для одновременного определения уровня антител к нескольким иммунодоминантным антигенам *Yersinia pestis*. Изучена возможность применения биочиповых технологий для оценки специфических антител к антигенам возбудителя чумы. Объект исследования — 5 коммерческих сывороток, 35 сывороток крови людей, вакцинированных живой чумной вакциной со сроками забора материала через 1, 4, 5, 18 месяцев после вакцинации, 5 сывороток здоровых доноров. Цель данной работы — разработка биологического микрочипа (иммуночипа) для выявления антител к антигенам возбудителя чумы. Для этого аминомодифицированные слайды сенсibilизировали препаратами иммунодоминантных антигенов *Y. pestis*: капсульного антигена F1, липополисахарида (ЛПС), основного соматического антигена (ОСА), фибринолизина, пестина ПП. Оценка диагностической специфичности и чувствительности иммуночипа осуществляли с использованием зарегистрированных гомо- и гетерологичных иммунобиологических препаратов и экспериментальных сывороток животных. Диагностическая эффективность иммуночипа составила 100%. Проведена оценка возможности применения иммуночипа для определения профиля специфических антител у людей, вакцинированных живой чумной вакциной. В качестве препарата сравнения использовали коммерческую иммуноферментную тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*». Применение иммуноферментной тест-системы позволило выявить наличие антител к антигену F1 *Y. pestis* у 77,1% вакцинированных людей в сроки забора материала от 1 до 18 месяцев после вакцинации в титре 1:160–1:2560. Оценка профиля антител с помощью иммуночипа показала присутствие антител к антигену F1 у 91,4% вакцинированных в титре 1:320–1:2560. Кроме того, использование иммуночипа позволило обнаружить антитела к ЛПС, ОСА, пестину ПП у 54,3; 20; 42% вакцинированных людей соответственно. Процент положительной сероконверсии у лиц, вакцинированных живой чумной вакциной, составил 77,1% по результатам ИФА, 91,4% к антигену F1 — по результатам анализа с применением иммуночипа, 94,3% — по результатам анализа с расширенной панелью антигенов. Применение нескольких антигенных маркеров в составе иммуночипа позволило выявить больший процент сероконверсии среди вакцинированных людей, чем традиционный иммуноферментный анализ. Полученные результаты указывают на перспективу применения иммуночипа для оценки гуморального иммунитета.

Ключевые слова: биочип, антитела, антигены, чума, иммунитет.

Адрес для переписки:

Уткин Денис Валерьевич
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел./факс: 8 (8452) 51-52-11 (служебн.).
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Contacts:

Denis V. Utkin
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone/Fax: +7 (8452) 51-52-11 (office).
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Библиографическое описание:

Уткин Д.В., Киреев М.Н., Гусева Н.П., Каплун Г.А., Куклев В.Е., Осина Н.А.
Разработка биологического микрочипа для выявления антител
к антигенам возбудителя чумы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2.
С. 393–398. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-393-398

Citation:

Utkin D.V., Kireev M.N., Guseva N.P., Kaplun G.A., Kuklev V.E., Osina N.A.
A microchip developed for detecting antibodies against plague-derived
antigens // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 393–398. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-2-393-398

A MICROCHIP DEVELOPED FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST PLAQUE-DERIVED ANTIGENS

Utkin D.V., Kireev M.N., Guseva N.P., Kaplun G.A., Kuklev V.E., Osina N.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Currently available Russia-made preparations intended for serological plague diagnostics are usually aimed at detecting antibodies to single bacterial antigens in the blood serum. To improve reliability of the data obtained, it is rational to use test systems to simultaneously quantify antibodies to several immunodominant *Y. pestis* antigens. An opportunity of using biochip technology for quantifying specific antibodies to *Yersinia pestis* antigens was investigated. To do this, 5 commercially available sera, 35 blood sera obtained from individuals vaccinated with live plague vaccine collected 1, 4, 5, 18 months after immunization, as well as 5 sera obtained from healthy donors were analyzed. The objective of this work was to develop a biological microchip (immunochip) for detecting antibodies specific to *Y. pestis*-derived antigens. In particular, amino-modified slides were sensitized by immunodominant *Yersinia pestis*-derived antigens: capsule antigen F1, lipopolysaccharide (LPS), main somatic antigen (MSA), fibrinolysin, and pestin PP. Diagnostic specificity and sensitivity of the immunochip were assessed by using the approved homo- and heterologous immune-biological preparations and experimental animal sera. It was found that the immunochip demonstrated a 100% diagnostic efficiency. An opportunity of applying this immunochip to determine specific antibody profile in individuals vaccinated with live plague vaccine was estimated. A commercially available ELISA-AB-F1 of *Yersinia pestis* kit was used for comparison that allowed to detect antibodies to *Y. pestis* F1 antigen in 77.1% of vaccinated individuals within the examined time period covering between 1 to 18 months post-vaccination, at titer 1:160–1:2560. In contrast, using the immunochip resulted in detecting F1 antigen-specific antibodies in 91.4% of samples post-vaccination at titer 1:320–1:2560. Moreover, such immunochip additionally allowed to detect antibodies specific to the remainder of *Y. pestis*-derived LPS, MSA, pestin PP in 54.3%, 20%, 42% of vaccinated individuals, respectively. The percentage of positive seroconversion in individuals vaccinated with live plague vaccine was 77.1% based on the ELISA data, 91.4% — to the F1 antigen according to the immunochip data, and 94.3% — by analyzing an extended antigen panel. Combining multiple antigenic markers in our immunochip allowed to identify greater seroconversion among vaccinated people compared to a standard ELISA. Thus, the data obtained suggest that the proposed immunochip technology might be promising in assessing developing humoral immunity.

Key words: biochip, antibodies, antigens, plague, immunity.

В настоящее время актуальным является создание и внедрение в медицинскую практику новейших методов лабораторной диагностики, обладающих высокой технологичностью, производительностью, информативностью и низкой себестоимостью анализа для одновременного выявления и характеристики патогенов по ряду признаков, то есть проведения многопараметрического или многофакторного анализа. Перечисленным требованиям удовлетворяют диагностические тест-системы на основе биологических микрочипов (биочипов). Технология биологических микрочипов позволяет осуществлять анализ как генетических маркеров, так и иммунобиологических молекул — антигенов, антител. В настоящее время разработаны биологические микрочипы для выявления ДНК и антигенов возбудителей особо опасных бактериальных инфекционных болезней: чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза [5, 6, 7, 11]; сконструирован иммуночип для выявления антител к антигенам возбудителя холеры [8, 9]. В то же время отсутствуют диагностические тест-системы для осуществления многофакторного иммуносерологического анализа для выявления антител к антигенам возбудителя чумы на основе технологии биочипов. Современные отечественные препараты, предназначенные для серологической диагностики чумы, направлены, как правило, на выявление в сыворотке крови человека антител к одному антигену возбудителя —

к капсульному антигену Фракции 1 (F1) [2]. Фактически, определяется уровень антител к антигену F1 *Yersinia pestis*, что не всегда отражает истинную картину формирования гуморального иммунитета. В частности, отмечено наличие антител к антигену F1 у 30% здоровых доноров и низкий уровень антител к F1 у постоянно прививающихся живой чумной вакциной людей [4, 10]. Для повышения достоверности результатов анализа целесообразно применение тест-систем для одновременного определения уровня антител к нескольким иммунодоминантным антигенам *Y. pestis*.

В связи с этим, целью данной работы была разработка и апробация биологического микрочипа (иммуночипа) для выявления антител к антигенам возбудителя чумы.

Материалы и методы

При разработке иммуночипа в качестве сенситина использовали препараты иммунодоминантных антигенов *Y. pestis*: F1, липополисахарид (ЛПС), основной соматический антиген (ОСА), фибринолизин, пестин ПП. Антигены наносили в концентрации 1 мг/мл на аминомодифицированные слайды (Corning, США) методом контактной печати с использованием миниплоттера Xact Microarrayer (LabNEXT, США). Каждый антиген наносили в трех повторах (рис. 1) в виде 16 идентичных зон на одном слайде.

Иммобилизацию антигенов осуществляли в течение 20 мин при температуре 60°C с последующей обработкой блокирующим буфером (0,5% бычий сывороточный альбумин в 0,01 ммоль фосфатно-солевого буферного раствора [ФСБ]) в течение 30 мин при температуре 23–35°C. Слайды высушивали путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 1 мин.

Для контроля специфичности иммуночипа использовали препараты иммуноглобулинов диагностических чумных (РУ № ФСР 2008/02592-270409, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); иммуноглобулинов диагностических псевдотуберкулезных (РУ № ФСР 2012/13947-101012, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); сыворотку диагностическую туляремию (РУ № ФСР 2011/10029, ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора); набор реагентов сывороток диагностических бруцеллезных anti-abortus и anti-melitensis (РУ № РЗН 2015/2181, ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора); сыворотки и асцитические жидкости мышей инбредной линии BALB/c, иммунизированных живой чумной вакциной и вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным при температуре 28°C и 37°C.

В качестве клинического материала исследовали 35 сывороток крови людей, вакцинированных живой чумной вакциной (ЖЧВ), со сроками забора материала после вакцинации от 1 до 18 месяцев; 5 сывороток людей, не вакцинированных живой чумной вакциной (контрольная группа).

В качестве тест-системы сравнения использовали тест-систему иммуноферментную для выявления антител к чумному микробу «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» (РУ № ФСР 2012/13946-101012, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Для выявления специфических антител в клиническом и биологическом материале использовали непрямой метод иммуноанализа. Исследуемые сыворотки вносили в лунки реакционных ячеек (Whatman, Великобритания) и инкубировали на термошейкере при температуре 37°C в течение 1 ч со скоростью вращения платформы 300 об./мин. После инкубации слайды отмывали троекратно ФСБ и вносили конъюгаты анти-IgG или анти-IgM антител с флуоресцентным красителем Alexa Fluor (Molecular Probes, США). Слайды инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч, отмывали троекратно ФСБ и высушивали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 1 мин. Регистрацию и учет результатов осуществляли с помощью многоканального флуоресцентного сканера микрослайдов GenePix 4100A (Molecular Devices, США). Уровень флуоресценции считали положительным, если его значение превышало в 2 раза значение флуоресценции в зонах нанесения отрицательного контроля.

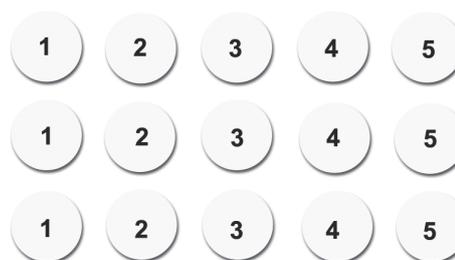


Рисунок 1. Схема размещения антигенов

Figure 1. A scheme depicting position of antigens

1 — F1, 2 — ЛПС, 3 — ОСА, 4 — фибринолизин, 5 — пестин ПП.
1 — F1, 2 — lipopolysaccharide, 3 — main somatic antigen, 4 — fibrinolysin, 5 — pestin PP.

Диагностическая чувствительность определялась как доля истинно положительных результатов к числу положительных проб. Диагностическая специфичность определялась как доля истинно отрицательных результатов к числу отрицательных проб.

Статистически рассчитывали достоверность различий между параметрами с уровнем значимости 0,95 с определением критерия Стьюдента (*t*). Доверительный интервал для доли оцениваемого параметра с 95% вероятностью рассчитывали по методу Уилсона с коррекцией [1] с использованием онлайн-калькулятора Wassar Stats: Web Site for Statistical Computation (<http://vassarstats.net/prop1.html>).

Результаты и обсуждение

По результатам иммунологического анализа при исследовании гомо- и гетерологичных сывороток и препаратов иммуноглобулинов диагностическая специфичность и чувствительность иммуночипа составила 100% с доверительным интервалом 80–100%.

Для оценки профиля специфических антител у вакцинированных живой чумной вакциной людей использовали иммуноферментную тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» и разработанный иммуночип. Несмотря на то что основную роль в формировании иммунитета при чуме играет клеточное звено, косвенную оценку эффективности вакцинации чумной вакциной осуществляют путем определения поствакцинальных титров антител [12, 13]. Для выявления антител к возбудителю чумы используют иммуноферментную тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») [2]. В данной работе проведена сравнительная оценка применения ИФА-тест-системы, позволяющей выявлять антитела к антигену F1 *Y. pestis* и иммуночипа на основе 5 антигенов чумного микроба.

Образцы сывороток крови людей исследовали в разведениях от 1:40 до 1:5120. По результатам ИФА, титры антител к антигену F1 *Y. pestis* в сыворотках крови вакцинированных людей через 1 месяц после вакцинации колебались в преде-

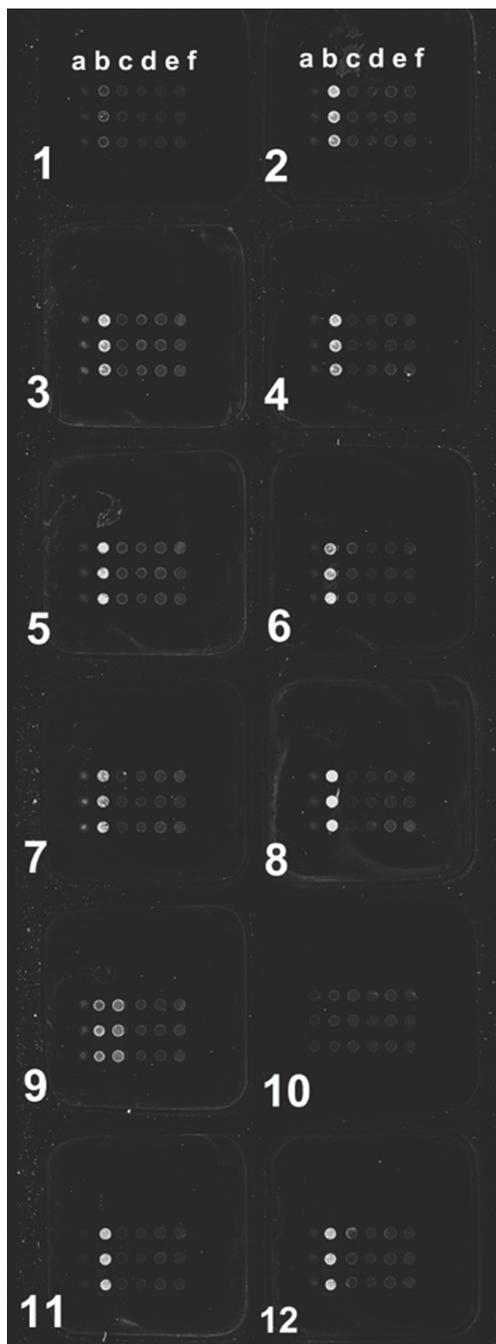


Рисунок 2. Флуоресцентный профиль иммуночипа. Анализ с сыворотками людей, вакцинированных живой чумной вакциной (2–9, 11, 12) и не вакцинированных (1, 10), в разведении 1:100

Figure 2. Immunochip fluorescent profile. Sera obtained from individuals vaccinated with live plague vaccine (2–9, 11, 12) and unvaccinated (1, 10) in at 1:100 dilution were analyzed

1–12 — номера исследуемых сывороток;
a-f — иммобилизованные антигены в пределах одного эррея: сорбционный буфер (a), F1 (b), 2 — ЛПС (c), 3 — ОСА (d), 4 — фибринолизин (e), 5 — пестин ПП (f).
1–12 — serial numbers of sera examined; a-f — antigens immobilized within a single array: sorption buffer (a), F1 (b), 2 — lipopolysaccharide (c), 3 — main somatic antigen (d), 4 — fibrinolysin (e), 5 — pestin PP (f).

лах 1:1280–1:2560, через 4–5 месяцев после вакцинации — на уровне 1:160–1:640, через 18 месяцев — 1:160–1:320. У 3 из 5 контрольных доноров (60%) обнаружены антитела к антигену F1 чумного микроба в титрах от 1:40 до 1:80.

По результатам анализа с использованием иммуночипа титр антител к антигену F1 *Y. pestis* в сыворотках крови вакцинированных людей соответствовал или был выше титров, установленных в ИФА: 1:1280–1:2560 — через 1 месяц после вакцинации, 1:320–1:1280 — через 4–5 месяцев после вакцинации, 1:320 — через 18 месяцев после вакцинации. В контрольной группе антитела к антигенам *Y. pestis* не выявлены (рис. 2). Полученные результаты подтверждают данные о высокой иммуногенности капсульного антигена F1 чумного микроба [10].

Применение ИФА-тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» позволило определить наличие антител к антигену F1 в сыворотке крови у 16 вакцинированных людей из 19 (84,2%) через 1 месяц после вакцинации, у 10 из 13 (76,9%) — через 4–5 месяцев, в 1 пробе из 3 (33,3%) — через 18 месяцев в контрольной группе антитела не выявлены (табл.).

При анализе с использованием иммуночипа процент положительной сероконверсии к антигену F1 был выше и составил: 89,5% — через 1 месяц после вакцинации, 92,3% — через 4–5 месяцев, 100% — через 18 месяцев. Кроме того, у 54,3 и 22,9% людей выявлены антитела к ЛПС и ОСА чумного микроба соответственно (табл.). Липополисахарид *Y. pestis* представляет собой поверхностный антиген, состоящий из корового липополисахарида, характерного для бактерий в R-форме, и самостоятельно функционирующих в клетке O-боковых цепей, получивших название основного соматического антигена. На ранних сроках после вакцинации (через 1 месяц) выявлены антитела к гаптенизированным формам ЛПС и ОСА в составе пестина ПП у 42% доноров. Антитела к фибринолизину в титре 1:100 не обнаружены, что может объясняться низким уровнем антител за счет экранирования фибринолизина клетки поверхностными капсульными и соматическими антигенами [3].

По результатам работы установлено, что процент положительной сероконверсии в ИФА у лиц, вакцинированных ЖЧВ, составил 77,1% (доверительный интервал для генеральной совокупности с 95% вероятностью составил 59,4–89%). По результатам анализа с применением иммуночипа антитела к F1 выявлены в 91,4% случаев (доверительный интервал для генеральной совокупности с 95% вероятностью составил 75,8–97,8%). При использовании расширенной панели антигенов циркуляция антител к антигенам *Y. pestis* обнаружена у 94,3% доноров (доверительный интервал для генеральной совокупности с 95% вероятностью составил 79,5–99%). Применение нескольких антигенных маркеров в составе им-

Таблица. Количество серопозитивных проб при анализе в ИФА и с использованием иммуночипа

Table. The number of seropositive samples in ELISA and in the analysis using the immunochip

Исследуемая группа (срок после вакцинации) Study group (post-vaccination time points)	Количество исследованных проб Number samples examined	Количество положительных проб в ИФА (доля, доверительный интервал, %) Number of positive samples by ELISA (percentage; confidence interval, %)	Количество проб, имеющих антитела к антигенам <i>Y. pestis</i> , по результатам анализа с использованием иммуночипа (доля, доверительный интервал, %) Number of samples positive for antibodies against <i>Y. pestis</i> -derived antigens by using immunochip (percentage; confidence interval, %)			
			F1	ЛПС LPS	ОСА Main somatic antigen	всего серопозитивных проб total seropositive samples
1 месяц 1 months	19	16 (84,2; 59,5–95,8)	17 (89,5; 65,5–98,2)	12 (63,2; 38,6–82,8)	1 (5,3; 0,3–28,1)	18 (94,7; 71,9–99,7)
4–5 месяцев 4–5 months	13	10 (76,9; 46,0–93,8)	12 (92,3; 62,1–99,6)	5 (38,5; 15,1–67,7)	5 (38,5; 15,1–67,7)	12 (92,3; 62,1–99,6)
18 месяцев 18 months	3	1 (33,3; 1,8–87,5)	3 (100,0; 31,0–100,0)	2 (66,7; 12,5–98,2)	2 (66,7; 12,5–98,2)	3 (100,0; 31,0–100,0)
Всего Total	35	27 (77,1; 59,4–89,0)	32 (91,4; 75,8–97,8)	19 (54,3; 36,9–70,8)	8 (22,9; 11,0–40,6)	33 (94,3; 79,5–99,0)
Контрольная группа Control group	5	0 (0)	0	0	0	0

муночипа позволило выявить больший процент сероконверсии, чем при использовании ИФА, что согласуется с литературными данными [4]. Однако статистический анализ не выявил достоверных различий в результатах при использовании двух методов: критерий Стьюдента составил $t = 1,47$ — при анализе одного маркера, $t = 1,57$ — при анализе нескольких маркеров с критическим значением $t = 2,776$. Выявленная трансгрессия доверительных интервалов для данной выборки исследований также свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между методами ИФА и иммуночиповой технологией.

Преимущество разработанного биочипа перед существующей ИФА-тест-системой — возможность выявления антител к соматическим антигенам возбудителя чумы.

В результате проведенных исследований разработан биологический микрочип для выявления антител к капсульному и соматическим антигенам возбудителя чумы. Применение иммуночипа позволяет осуществлять верификацию диагностических исследований, направленных на обнаружение специфических антител к антигенам возбудителя чумы для оценки формирования гуморального иммунитета.

Список литературы/References

- Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей // Экология человека. 2008. № 5. С. 57–60. [Grjibovskiy A.M. Confidence intervals for proportions. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2008, no. 5, pp. 57–60. (In Russ.)]
- Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е., Тараненко Т.М., Киреев М.Н., Терехова И.В., Григорьева Г.В., Исляева М.Н., Ермаков Н.М., Виноградова Н.А., Малахаева А.Н. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-АТ-Ф1) *Yersinia pestis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 1. С. 74–77. [Devdariani Z.L., Tereshkina N.E., Taranenko T.M., Kireev M.N., Terekhova I.V., Grigor'eva G.V., Islyaeva M.N., Ermakov N.M., Vinogradova N.A., Malakhaeva A.N. Results of modeling experiments in designing immuno-enzyme test-system for the detection of antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*). *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2013, no. 1, pp. 74–77. (In Russ.)]
- Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазминогена чумного микроба // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 27–36. [Evseeva V.V., Platonov M.E., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 27–36. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-27-36 (In Russ.)]
- Ляпина А.М., Федорова В.А., Хижнякова М.А., Теплепнев М.В., Мотин В.Л. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей // Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12, № 3. С. 85–87. [Lyapina A.M., Fedorova V.A., Khizhnyakova M.A., Tepnepnev M.V., Motin V.L. Recombinant polypeptides as biomarkers for evaluating immunological efficacy of vaccination with live plague vaccine in humans. *Meditinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 85–87. (In Russ.)]
- Никифоров К.А., Уткин Д.В., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Конструирование ДНК-чипа для дифференциации основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида *Yersinia pestis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 2. С. 32–35. [Nikiforov K.A., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Construction of a DNA-microarray for dif-

- ferentiation between the main and non-main subspecies and biovars of the main subspecies of *Yersinia pestis*. *Problemy osobno opasnykh infektsii* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 2, pp. 32–35. doi: 10.21055/0370-1069-2017-2-32-35 (In Russ.)]
6. Пудова Е.А., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Чеканова Т.А., Сажин А.И., Кирдяшклина Н.П., Бекова М.В., Девяткин А.А., Шипулин Г.А. Разработка набора реагентов в формате ДНК-чипа для генотипирования штаммов *Vibrio cholerae* // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 5. С. 47–52. [Pudova E.A., Markelov M.L., Dedkov V.G., Tchekanova T.A., Sazhin A.I., Kirdiyashkina N.P., Bekova M.V., Deviyatkin A.A., Shipulin G.A. The development of reagents set in the format of DNA-chip for genetic typing of strains of *Vibrio cholerae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2014, no. 5, pp. 47–52. (In Russ.)]
 7. Пудова Е.А., Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Кирдяшклина Н.П., Карасева И.П., Сажин А.И., Зацепин Т.С., Уткин Д.В., Осина Н.А., Щербакова С.А., Шипулин Г.А. Разработка и апробация ДНК-чипа для индикации возбудителей особо опасных инфекций // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 3. С. 13–19. [Pudova E.A., Chekanova T.A., Markelov M.L., Dedkov V.G., Kirdiyashkina N.P., Karaseva I.P., Sazhin A.I., Zatsepin T.S., Utkin D.V., Osina N.A., Shcherbakova S.A., Shipulin G.A. Development and testing of a DNA microarray for identification of particularly dangerous infectious pathogens. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy* = *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2014, no. 3, pp. 13–19. (In Russ.)]
 8. Уткин Д.В., Осина Н.А., Киреев М.Н., Спицын А.Н., Щербакова С.А. Биологический микрочип для выявления и многопараметрического анализа противохолерных антител. Патент РФ на изобретение. RUS 2528099 // Изобретения. Полезные модели: Бюллетень, № 25 от 10.09.2014. [Utkin D.V., Osina N.A., Kireev M.N., Spitsyn A.N., Shcherbakova S.A. A biological microchip for the detection and multiparameter analysis of the cholera antibodies. RF patent for the invention. RUS 2528099. *Izobreteniya. Poleznye modeli: Bulletin* = *Bulletin of the Invention. Useful models*, no. 25, 10.09.2014. (In Russ.)]
 9. Уткин Д.В., Осина Н.А., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Громова О.В., Захарова Т.Л., Найденова Е.В., Куклев В.Е. Разработка биочипа для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 2. С. 50–53. [Utkin D.V., Osina N.A., Spitsyn A.N., Kireev M.N., Gromova O.V., Zakharova T.L., Naidenova E.V., Kuklev V.E. The development of biochip to detect anti-cholera antibodies in human blood serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 50–53. (In Russ.)]
 10. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы // Иммунология, аллергология, инфектология. 2015. № 3. С. 62–68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbатов A.A., Kravchenko T.B., Tjurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya* = *Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 3, pp. 62–68. doi: 10.14427/jipai.2015.3.62 (In Russ.)]
 11. Goji N., MacMillan T., Amoako K.K. A new generation microarray for the simultaneous detection and identification of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* in food. *J. Pathogens*, 2012, vol. 2012, pp. 1–8. doi: 10.1155/2012/627036
 12. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, vol. 17, no. 7. pp. 1055–1065. doi: 10.1128/CVI.00131-10
 13. Williamson E.D., Oyston P.C.F. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, vol. 172, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1111/cei.12044

Авторы:

Уткин Д.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностических технологий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Киреев М.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Гусева Н.П., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Каплун Г.А., научный сотрудник лаборатории оперативной диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Куклев В.Е., к.м.н., зав. лабораторией диагностических технологий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Осина Н.А., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной диагностики ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Utkin D.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Diagnostics Technologies, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Kireev M.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cholera Vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Guseva N.P., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genomic and Proteomic Analysis, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Kaplun G.A., Researcher, Laboratory of Operative Diagnostics of Infectious Diseases, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Kuklev V.E., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Diagnostics Technologies, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Osina N.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Diagnostics, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.11.2018
 Отправлена на доработку 04.03.2019
 Принята к печати 05.04.2019

Received 04.11.2018
 Revision received 04.03.2019
 Accepted 05.04.2019

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *FLAVOBACTERIUM*

А.Г. Семанин, Г.Р. Садртдинова

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, г. Ульяновск, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования, связанные с подбором эффективного метода выделения бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Flavobacterium*. Число бактериальных штаммов, используемых в работе — 3. Все штаммы культур получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина и имеют характерные для данного рода (и видов) тинкториальные и биохимические свойства. Исследования состояли из 4 серий опытов. Первая серия опытов была связана с апробацией методики по выделению бактериофага без использования воздействующего фактора. В результате искомым бактериофагом выделено не было. Вторая серия опытов заключалась в апробации метода выделения с использованием индуцирующего фактора — ультрафиолетового облучения. Расстояние до объектов облучения — 0,3 м. Время экспозиции: 1, 3, 5, 10, 15 мин. Третья серия опытов также была связана с использованием индуцирующего фактора — рентгеновского облучения. В ходе работы были определены 3 рабочих режима, каждый из которых отличался длительностью экспозиции, периодичностью воздействия и полученной дозой облучения. В результате исследований, связанных с использованием индуцирующих факторов, искомым бактериофагом выделено не было. Последняя серия опытов заключалась в выделении бактериофагов из объектов внешней среды — мест естественного (возможного) существования «хозяина» (изучаемого микроорганизма) и вируса (искомого бактериофага). Из объектов внешней среды было выделено 3 изолята фага: FL-j-1, FL-pec-2, FL-aq-3. Бактериофаг FL-j-1 активен в отношении штамма *F. johnsoniae* VKM B-1426, бактериофаг FL-pec-2 активен в отношении штамма *F. pectinovorum* VKM B-1171, бактериофаг FL-aq-3 активен в отношении штамма *F. aquatile* VKPM B-8534. Дальнейшие исследования могут быть связаны с изучением свойств выделенных бактериофагов: специфичности в отношении данного рода, чувствительности, литической активности, отбором наиболее перспективных штаммов фагов, дальнейшей селекцией отобранных бактериофагов, возможности использования данных бактериофагов в методе реакции нарастания титра фага с целью индикации изучаемого микроорганизма.

Ключевые слова: бактерии, бактериофаги, выделение, метод, морфология, литическая активность.

Адрес для переписки:

Семанин Антон Геннадьевич
433430, Россия, Ульяновская область, Чердаклинский район,
пос. Октябрьский, ул. Студенческая, 8,
Ульяновский ГАУ им. П.А. Столыпина.
Тел.: 8 (84231) 5-12-68, 8 (8422) 49-55-63.
E-mail: anton-vet@mail.ru

Contacts:

Anton G. Semanin
433430, Russian Federation, Ulyanovsk region, Cherdaklinskii
district, Oktjabrski village, Studencheskaia str., 8, Ulyanovsk State
Agrarian University named after P.A. Stolypin.
Phone: (office).
E-mail: anton-vet@mail.ru

Библиографическое описание:

Семанин А.Г., Садртдинова Г.Р. Выбор оптимального метода выделения бактериофагов бактерий рода *Flavobacterium* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 399–403. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-399-403

Citation:

Semanin A.G., Sadrtidinova G.R. Choosing a proper approach for isolating bacteriophages specific to *Flavobacterium* genus bacteria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 399–403. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-399-403

CHOOSING A PROPER APPROACH FOR ISOLATING BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO FLAVOBACTERIUM GENUS BACTERIA

Semanin A.G., Sadrtidinova G.R.

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russian Federation

Abstract. The article presents results of research related to the selection of an effective method for isolating bacteriophages active against bacteria of the genus *Flavobacterium*. The number of bacterial strains used in the work — 3. All strains cultures were obtained from the museum of the department of microbiology, virology, epizootiology and veterinary-sanitary examination of federal state budgetary educational institution of higher education Ulyanovsk «State Agricultural University named after PA Stolypin» and have tinctorial and biochemical properties characteristic for this genus (and species). The studies consisted of 4 series of experiments. The first series of experiments was connected with the approbation of a technique for isolating a bacteriophage without using an influencing factor. As a result, the desired bacteriophages were not isolated. The second series of experiments consisted in testing the isolation method using an inducing factor—ultraviolet irradiation. The distance to the objects of irradiation is 0.3 m. Exposure time: 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min. The third series of experiments was also associated with the use of inducing factor X-ray irradiation. In the course of the work, three operating modes were determined, each of which differed in the duration of the exposure, the periodicity of the exposure, and the dose received. As a result of studies related to the use of inducing factors, the desired bacteriophages were not identified. The last series of experiments was to allocate bacteriophages from the objects of the natural places commemorative (possible) existence of the «owner» (the studied microorganism) and viruses (bacteriophage desired). Three phage isolates were isolated from environmental objects: FL-j-1, FL-pec-2, FL-aq-3. Bacteriophage FL-j-1 is active against a strain of *F. johnsoniae* VKM B-1426 bacteriophage FL-pec-2 is active against strain *F. pectinovorum* VKM B-1171 bacteriophage FL-aq-3 strain active against *F. aquatile* VKPM B-8534. Further studies may be related to study properties of the isolated phages: study of the specificity in respect of this kind of sensitivity study, the study and higher lytic activity, selection of the most promising strains phages further selection of selected phages, as well as studying the possibility of bacteriophages from use in the method of the reaction increase titer phage for the purpose of indicating the microorganism being studied.

Key words: *bacteria, bacteriophages, isolation, method, morphology, lytic activity.*

Введение

Представители рода *Flavobacterium* являются возбудителями многих заболеваний рыб («холодноводная бактериальная болезнь», «обжаренный синдром радужной форели», бактериальная жаберная болезнь) и обнаруживаются во многих объектах окружающей среды (вода, почва и т.д.) [7]. Заболевания, вызываемые данным микроорганизмом, приводят к 100% смертности у рыб и наносят существенный ущерб экономики отрасли. Механизмы вирулентности бактерий рода *Flavobacterium* по-прежнему до конца неясны. Для предотвращения массовой смертности на рыбных фермах широко применяют антибиотики. Однако частое использование антибиотиков приводит к снижению чувствительности к данным препаратам у бактерий и выработке у них резистентности.

Во избежание рисков, связанных с применением в отрасли антибиотиков, использование бактериофагов в качестве экологического метода может быть эффективным решением по снижению частоты возникновения инфекций рыб, вызванных данным патогеном. На данный момент исследователями выделено более 60 фагов, активных в отношении представителей рода *Flavobacterium*, описаны механизмы взаимодействия фагов и бактерий [6].

Цель исследования заключалась в выборе наиболее эффективного метода выделения бактериофагов бактерий рода *Flavobacterium*.

Материалы и методы

В работе использовали референс-штаммы бактерий изучаемого рода: *F. pectinovorum* VKM B-1171, *F. aquatile* VKPM B-8534, *F. johnsoniae* VKM B-1426. Данные штаммы имеют типичные для данного рода (вида) тинкториальные свойства и проявляют характерную биохимическую активность (по результатам предыдущих исследований).

Выделение бактериофагов основывали на использовании общепринятых методов выделения (с учетом особенностей изучаемого микроорганизма): температура культивирования посевов — 25°C; время культивирования посевов — до 48 ч; количество оборотов в минуту при центрифугировании — 3000 об./мин; «рабочая жидкая среда» (для манипуляций в пробирках) — Enriched Anacker and Ordal medium; «рабочая твердая среда» (для манипуляций в чашках Петри) — Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением агар-агара.

Выделение бактериофагов без воздействия индуцирующего фактора [1]. В колбу с 50 мл

жидкой среды Enriched Anacker and Ordal medium вносили по 1,0 мл всех изучаемых штаммов (суточных). Колбу с посевом инкубировали в условиях термостата при 25°C в течение 5 суток. После этого содержимое колбы разливали по 10 мл в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин. Полученный центрифугат (надсадочная жидкость) обрабатывали хлороформом (1:10) интенсивным встряхиванием пробирки в течение 30 мин. Надсадочную жидкость переносили в чистую пробирку и исследовали методом агаровых слоев по Грациа (температура культивирования — 25°C, время культивирования — 48 ч).

Выделение бактериофагов индуцирующим фактором — использование ультрафиолетового облучения [2].

Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали ультрафиолетовым облучением, являющимся индуцирующим фактором. Источник облучения лампа «Philips» с длиной волны 250 нм. Расстояние до объектов облучения — 0,3 м. Длительность облучения: 1, 3, 5, 10, 15 мин.

Схема проводимых исследований:

— 1 день: суточные культуры изучаемых штаммов сплошным газом высевали на твердую среду Enriched Anacker and Ordal medium, подсушивали в термостате 10–15 мин, облучали. После этого чашки инкубировали в термостате при 25°C в течение суток.

— 2 день: шпателем распределяли выросшие колонии бактерий по поверхности среды, облучали. После этого чашки инкубировали в термостате при 25°C в течение суток.

— 3 день: шпателем распределяли выросшие колонии бактерий по поверхности среды, облучали. После этого чашки инкубировали в термостате при 25°C в течение суток.

— 4 день: жидкой средой Enriched Anacker and Ordal medium делали смывы с чашек, центрифугировали при 3000 об./мин — 15 мин, обрабатывали хлороформом (1:10) в течение 30 мин, отбирали надсадочную жидкость в новую пробирку. Полученную суспензию исследовали методом агаровых слоев по Грациа.

— 6 день: учитывали результаты, присутствие бактериофага фиксировали по наличию зон лизиса.

Выделение бактериофагов индуцирующим фактором — использование рентгеновского облучения [2]. Рентгеновское облучение является более мощным фактором по сравнению с ультрафиолетовым облучением. В работе использовали 3 режима.

Таблица. Результаты выделения фагов бактерий рода *Flavobacterium* различными методами
Table. Methods used to verify bacteriophages specific to *Flavobacterium* genus bacteria

Исследуемый штамм Bacterial strain examined	Метод выделения Isolation method														
	ультрафиолетовое облучение ultraviolet irradiation						рентгеновское облучение X-ray irradiation						из внешней среды from environmental source		
	параметры parameters			параметры parameters			параметры parameters			параметры parameters					
3 мин 3 min.	5 мин 5 min.	10 мин 10 min.	15 мин 15 min.	I режим mode I	II режим mode II	III режим mode III	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones	наличие зон лизиса presence of lysis zones	наличие зон лизиса presence of lysis zones	
<i>F. pestinovorum</i> VKM B-1171	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones
<i>F. aquatile</i> VKM B-8534	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones
<i>F. johnsoniae</i> VKM B-1426	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones

Схема проводимых исследований:

– 1 режим: I периода облучения, длительность периода — 1,6 с, доза облучения — 2,0 мЗв;

– 2 режим: II периода, каждый по длительности 1,6 с, общая доза облучения — 4,0 мЗв;

– 3 режим: III периода, каждый период по 1,6 с, общая доза облучения — 6,0 мЗв.

После облучения пробирки с культурами инкубировали при 25°C в течении 48 ч, с фиксацией результатов каждые 4 ч. В качестве контроля использовали посев изучаемой культуры в жидкую среду Enriched Anacker and Ordal medium без дальнейшего облучения пробирки. Контрольную пробирку инкубировали при тех же временных и температурных условиях. После 48 ч инкубирования, содержимое пробирок исследовали на наличие фагов методом агаровых слоев по Грациа.

Выделение бактериофагов из объектов внешней среды [3, 4, 6]. В колбу, содержащую 0,5 л стерильной жидкой среды Enriched Anacker and Ordal medium вносили по 1 мл сточных вод и по 1 мл всех изучаемых штаммов. Колбу с посевом инкубировали в термостате в течение 5 суток при 25°C. Затем содержимое колбы разливали в стерильные центрифужные пробирки по 10 мл и центрифугировали при 3000 об./мин в течении 10 мин. После этого отбирали надосадочную жидкость и обрабатывали ее хлороформом, интенсивно встряхивая 30 мин. Отбирали надосадочную жидкость и переносили в чистую пробирку. Полученный таким образом предполагаемый фаголизат исследовали методом агаровых слоев по Грациа.

Результаты

Результаты проведенных исследований представлены в таблице и на рисунке (II обложка).

При выделении бактериофагов без использования индуцирующего фактора наличие негативных колоний не обнаружено, бактериофагов выделено не было. Использование в исследованиях индуцирующих факторов (ультрафиолетового облучения и рентгеновского облучения) также не привели к выделению искомым фагов.

В результате проведенных исследований по выделению фагов из объектов внешней среды, было выделено 3 изолята фага: FL-j-1, FL-pec-2, FL-aq-3.

Бактериофаг FL-j-1 образовывал полупрозрачные негативные колонии неправильной округлой формы, диаметр колоний — 2–4 мм, проявляет свою активность в отношении штамма *F. johnsoniae* VKM B-1426.

Бактериофаг FL-pec-2 образовывал полупрозрачные негативные колонии неправильной округлой формы, диаметр колоний — 3–7 мм, проявляет свою активность в отношении штамма *F. pectinovorum* VKM B-1171.

Бактериофаг FL-aq-3 образовывал полупрозрачные негативные колонии неправильной округлой формы, диаметр колоний — 2–5 мм, проявляет свою активность в отношении штамма *F. aquatile* VKPM B-8534.

Обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее эффективным методом при выделении бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Flavobacterium*, является выделение фагов из объектов внешней среды. Изучение морфологии негативных колоний у выделенных бактериофагов позволяет сделать заключение о схожести морфологических признаков. Дальнейшие исследования могут быть связаны с определением специфичности данных бактериофагов в отношении изучаемого рода микроорганизма, чувствительности, изучением и повышением литической активности, а также возможности использования данных бактериофагов в реакции нарастания титра фага с целью индикации изучаемого микроорганизма.

Благодарности

Выражаем благодарность Научно-исследовательскому инновационному центру по микробиологии и биотехнологии» (г. Ульяновск) за финансовую поддержку проводимых исследований.

Список литературы/References

1. Бульканова Е.А., Золотухин С.Н. Выделение бактериофагов рода *Klebsiella* из сточных вод // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2004. № 12. С. 40–42. [Bul'kanova E.A., Zolotukhin S.N. Isolation of bacteriophages of the genus *Klebsiella* from wastewater. *Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2004, no. 12, pp. 40–42. (In Russ.)]
2. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Садрtdинова 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., Sadrtidnina G.R. Comparative efficiency of extraction methods of *Klebsiella oxytoca* bacteriophages. *Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2015, no. 4 (32), pp. 68–72. doi: 10.18286/1816-4501-2015-4-68-72 (In Russ.)]

3. Васильев Д.А., Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Садртдинова Г.Р. Бактериофаги рода *Citrobacter* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2017. № 3 (39). С. 40–45. [Vasilyev D.A., Pulcherovskaya L.P., Zolotukhin S.N., Sadrtdinova G.R. Bacteriophages of *Citrobacter* genus. *Vestnik Ul'yanskovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Bulletin of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2017, no. 3(39), pp. 40–45. doi: 10.18286/1816-4501-2017-3-40-44 (In Russ.)]
4. 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 pseudotuberculosis bacteriophages. *Veterinarnaya meditsina* = *Veterinary Medicine*, 2009, no. 4, pp. 19–20. (In Russ.)]
5. Christiansen R.H., Madsen L., Dalsgaard I., Castillo D., Kalatzis P.G., Middelboe M. Effect of bacteriophages on the growth of *Flavobacterium psychrophilum* and development of phage-resistant strains. *Microbial Ecology*, 2016, vol. 71, no. 4, pp. 845–859.
6. Efreitorova E.O., Pulcherovskaya L.P. Indication of *Citrobacter* bacterias in the environment using bacteriophages in the phage titer increase reaction. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 2016, no. 10, pp. 193–196. doi: 10.18551/rjoas.2016-10.22
7. Nakai T., Park S.C. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 2002, vol. 153, iss. 1, pp. 13–18.

Авторы:

Семанин А.Г., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия;

Садртдинова Г.Р., к.б.н., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия.

Authors:

Semanin A.G., PhD Student, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk Region, Russian Federation;

Sadrtdinova G.R., PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.04.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 26.03.2019

Received 27.04.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 26.03.2019

ВОЗМОЖНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА ПРИ СОЧЕТАНИИ МЕТОДОВ ИММУНОБЛОТТИНГА И АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

С.С. Ветчинин, И.Ю. Щит, А.Г. Шевяков, С.Ф. Бикетов

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

Резюме. В системах классификации опасных бактериальных патогенов возбудители мелиоидоза и сапа входят в число наиболее опасных для человека. Кроме того, *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* являются потенциальными агентами биотерроризма. В связи с этим своевременная диагностика этих микроорганизмов является актуальной. В настоящей работе предпринята попытка разработать способ выявления патогенных буркхольдерий, основанный на сочетании видоспецифичной амплификации ДНК и штаммоспецифичного дот-блот анализа на основе моноклональных антител (МКАт). В работе использовали следующие штаммы патогенных буркхольдерий: *B. mallei* (С-4, С-5, t-12, В-120, Р-1, Муksuwar-11, Z-12, Zagreb, Ivanovich, 5534), *B. pseudomallei* (100, 102, 115, 116, 132, 135, 301, 51274, 60913, 61503). Детекцию патогенов проводили методами ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и дот-блота на основе моноклональных антител к поверхностным структурам буркхольдерий. Для ПЦР-РВ были сконструированы оригинальные праймеры к фрагменту ДНК IS407A-flhP *B. mallei* и к гену Orf12 *B. pseudomallei*. Для реакции ПЦР-РВ ДНК выделяли из суспензии бактериальных клеток в концентрации 1×10^4 микробных клеток/мл. Накопление конечного продукта реакции регистрировали с использованием красителя SYBR Green I. Для определения специфичности реакции амплификации регистрировали температуры плавления (T_m) полученных продуктов и проводили их электрофоретический анализ. Показано, что при использовании праймеров к фрагменту ДНК IS407A-flhP выявляются все 10 исследованных штаммов *B. mallei*, а праймеров к гену Orf12 — все 10 штаммов *B. pseudomallei*. Сигналов с ДНК гетерологичных микроорганизмов (выделенной из бактериальных суспензий с концентрацией 1×10^7 м.к./мл), в ПЦР-РВ получено не было. Таким образом, ПЦР-РВ дает возможность проводить межвидовую дифференциацию патогенных буркхольдерий. В дот-блот анализе МКАт 3D3 связываются с клетками штаммов обоих возбудителей, то есть демонстрируют родоспецифичность. Моноклональные антитела 2D11, в отличие от МКАт 3D3, избирательно не связываются с клетками штаммов Р1 *B. mallei* и 100 *B. pseudomallei*, то есть обладают штаммоспецифическим профилем взаимодействия. Сделан вывод о том, что сочетание видоспецифичной амплификации ДНК (ПЦР-РВ) и иммунного анализа (дот-блот), с использованием набора моноклональных антител различного профиля взаимодействия со штаммами, перспективно для внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, моноклональные антитела, ПЦР-РВ, дот-блот.

Адрес для переписки:

Шевяков Антон Георгиевич
142279, Россия, Московская область, Серпуховский р-н,
п. Оболенск, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии.
Тел.: 8 (4967) 36-07-73 (служебн.).
E-mail: shevyakov@obolensk.org

Contacts:

Anton G. Shevyakov
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology and
Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-07-73 (office).
E-mail: shevyakov@obolensk.org

Библиографическое описание:

Ветчинин С.С., Щит И.Ю., Шевяков А.Г., Бикетов С.Ф. Возможность выявления штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза при сочетании методов иммуноблоттинга и амплификации ДНК // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 404–408. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-404-408

Citation:

Vetchinin S.S., Shchit I.Yu., Shevyakov A.G., Biketov S.F. The possibility of identifying individual strains of glanders and melioidosis pathogens with a combination of immunoblotting and DNA amplification methods // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 404–408. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-404-408

THE POSSIBILITY OF IDENTIFYING INDIVIDUAL STRAINS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS PATHOGENS WITH A COMBINATION OF IMMUNOBLOTTING AND DNA AMPLIFICATION METHODS

Vetchinin S.S., Shchit I.Yu., Shevyakov A.G., Biketov S.F.

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

Abstract. Causative agents of melioidosis and glanders are among the most dangerous bacterial pathogens for human. Moreover, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* are considered to be potential bioterrorism agents. In connection with this, timely diagnostics of such bacteria is of high importance. In our study, we made an attempt to develop an approach for detecting pathogenic *Burkholderia* spp. by combining species-specific amplification and strain-specific dot blotting assay with monoclonal antibodies. The following pathogenic *Burkholderia* strains were used in experiments: *B. mallei* (C-4, C-5, t-12, B-120, P-1, Muksuwar-11, Z-12, Zagreb, Ivanovich, 5534), and *B. pseudomallei* (100, 102, 115, 116, 132, 135, 301, 51274, 60913, 61503). Real-Time PCR (RT-PCR) and dot blotting with monoclonal antibodies against surface *Burkholderia* epitopes were used to detect such pathogens. RT-PCR was carried out by using primers designed to recognize DNA fragments in *B. mallei* IS407A-flp and the gene Orf12 from *B. pseudomallei*. For this, DNA was isolated from bacterial cells suspended at 1×10^4 microbial cells/ml. accumulation of the end reaction products was visualized by staining with dye SYBR Green I. Specificity of amplification reaction was determined by measuring melting temperature (T_m) for end products followed by running gel electrophoresis. It was demonstrated that all ten strains of either *B. mallei* or *B. pseudomallei* examined in the study were detected by using primers against IS407A-flp DNA fragment and the gene Orf12, respectively. It was demonstrated that all ten strains of either *B. mallei* or *B. pseudomallei* examined in the study were detected by using primers against IS407A-flp DNA fragment and the gene Orf12, respectively. Importantly, no signals specific to heterologous microbial DNA (isolated from bacterial cell suspension at concentration of 1×10^7 microbial cells/ml) were detected by using RT-PCR. Thus, RT-PCR provides an opportunity for assessing an inter-species diversity among pathogenic *Burkholderia* species. A genus-specificity was observed by using monoclonal antibodies 3D3 which bind to both *Burkholderia* strains, whereas antibodies 2D11 exhibited no selective binding to strain P1 *B. mallei* and strain 100 *B. pseudomallei*, thereby displaying a strain-specific interaction. Thus, it allowed to conclude that combining a species-specific DNA amplification particularly RT-PCR together with immune-based assay such as dot blotting by using a panel of monoclonal antibodies seems to be a promising approach for assessing intra-species diversity among pathogenic *Burkholderia*.

Key words: glanders, melioidosis, monoclonal antibody, RT-PCR, dot-blot.

Введение

Сап и мелиоидоз относятся к особо опасным заболеваниям, вызываемым патогенными буркхольдериями *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. Основными источниками заражения являются больные животные, контаминированные пищевые продукты, почва и вода. Невозможность вакцинопрофилактики, высокие контагиозность и смертность (при отсутствии лечения) позволяют отнести возбудителей сапа и мелиоидоза к потенциальным агентам биотерроризма [7, 9, 13].

Для выявления и идентификации возбудителей применяют классические бактериологические и биохимические методы, а также современные иммунохимические тесты, использующие моноклональные антитела (МКАт) и молекулярную диагностику на основе анализа специфических нуклеотидных последовательностей ДНК [1, 8, 12]. Опубликованы результаты применения амплификации ДНК для детекции и дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* посредством ПЦР, включая мультиплексный вариант [3, 11] и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [14, 15]. На основе высокопроизводительного секвенирования активно разрабатываются подходы для внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий.

Цель данной работы — установление возможности выявления и внутривидовой дифферен-

циации штаммов патогенных буркхольдерий при совместном использовании ПЦР-РВ и дот-блот анализа на основе (МКАт).

Материалы и методы

В работе использованы по 10 штаммов *B. mallei* (C-4, C-5, t-12, B-120, P-1, Muksuwar-11, Z-12, Zagreb, Ivanovich, 5534) и *B. pseudomallei* (100, 102, 115, 116, 132, 135, 301, 51274, 60913, 61503) из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В качестве контрольных гетерологичных микроорганизмов использовали следующие штаммы: *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* И-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC ВАА-427 (все из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk»).

Все работы с микроорганизмами I–II групп и ДНК микроорганизмов I–IV групп выполняли в соответствии с соответствующими нормативными документами [2, 4].

Для ПЦР ДНК выделяли из бактериальных суспензий *B. mallei* и *B. pseudomallei* с концентрацией 1×10^4 м.к./мл микроорганизмов с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ОАО «ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Таблица. Праймеры для детекции *B. pseudomallei* и *B. mallei* с помощью ПЦР в реальном времениTable. Real-time PCR primers for detection of *B. pseudomallei* and *B. mallei*

Праймер Primers	Последовательность праймера Primer sequence	Мишень Target
F3-Bma54	5'-gcttcctcagaaacccgat-3'	IS407A-flIP <i>B. mallei</i>
B3-Bma54	5'-ggcagcactattcgttgag-3'	
F3-Bp27	5'-attcaggttgatgctggagg-3'	Orf12 области кластера генов TTS1 <i>B. pseudomallei</i> Orf12 regions in gene cluster TTS1
B3-Bp27	5'-cgataatgctctgccgcc-3'	

Нуклеотидные последовательности праймеров рассчитывали с помощью программы «Primer Explorer 3» (www.primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html) и проверяли на специфичность с использованием программы «BLAST» (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Праймеры синтезированы и очищены компанией «Синтол», Москва. Последовательности праймеров представлены в таблице.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе «7500 Real-Time PCR Systems» (Applied Biosystems, США) в следующем режиме: первичная денатурация (95°C — 10 мин), 40 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 1 мин. Считывание флуоресценции. Построение кривой плавления интервале от 60 до 95°C. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1x буфер Б с красителем SYBR Green I, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого дНТФ, праймеры 0,4 мкМ каждого, 5 мкл матрицы (0,1 мкг ДНК). Накопление специфического продукта амплификации — фрагмента ДНК *B. mallei* или *B. pseudomallei* — детектировалось по каналу FAM/SYBR Green dye. Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems. Накопление продукта регистрировали по изменению флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green I, для определения специфичности реакции проводили анализ кривой плавления и вычисление температуры плавления (T_m) полученных продуктов [6].

Моноклональные антитела 2D11 (гибридома получена после иммунизации мышей ЛПС из штамма С-5 *B. mallei*) [5], нарабатывали в асцитной жидкости и очищали методом аффинной хроматографии на белок А-сефарозе.

Для дот-блот анализа на полоски из нитроцеллюлозной бумаги наносили по 2 мкл суспензии бактериальных клеток с концентрацией 10⁹ мк/мл. Полоски подсушивали, инкубировали при покачивании в 5% растворе альбумина, последовательно промывали в 0,1 М фосфатного буферного раствора рН 7,4 (ФБР) и ФБР с 10 mM твин 20 (ФБРТ) инкубировали с МКАт в концентрации 1 мкг/мл или (в отрицательном контроле) с нормальной мышиной сывороткой в разведении 1:1000, а затем с пероксидазным конъюгатом кроличьих антител к IgG мыши в рабочем разведении. После промывки ФБРТ и деионизованной водой, полоски инкубировали с субстратом (0,2 мг/мл диаминобензидина) до появления видимых пятен.

Результаты и обсуждение

В результате амплификации в ПЦР-РВ фрагментов генов-мишеней IS407A-flIP *B. mallei* и Orf12 *B. pseudomallei* были получены специфические продукты. Как видно из рисунка 1, на кривых плавления находятся единичные пики, соответствующие ожидаемым размерам продуктов амплификации.

Кроме того, при анализе продуктов ПЦР-РВ с помощью гель-электрофореза в геле были детектированы единичные полосы с ожидаемыми размерами: 202 п.н. в случае праймеров Bma54, 194 п.н. в случае праймеров Bp27. Таким образом Bma54 выявлял штаммы *B. mallei*, а Bp27 — *B. pseudomallei*. Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ с указанными праймерами была определена в отдельных экспериментах и составила 1 × 10² м.к./мл. В реакции по определению специфичности брали ДНК выделенную из бактериальных суспензий штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* с концентрацией 1 × 10⁴ м.к./мл.

Сигналов с ДНК гетерологичных микроорганизмов (выделенной из бактериальных суспензий с концентрацией 1 × 10⁷ м.к./мл), в ПЦР-РВ получено не было.

Таким образом, рассчитанные нами праймеры в реакции ПЦР-РВ обеспечивали видоспецифическую детекцию всех использованных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрациях от 1 × 10² м.к./мл.

Результаты проверки взаимодействия МКАт 2D11 и МКАт 3D3 с бактериальными клетками тех же штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* в дот-блот анализе показали следующее. Моноклональные антитела 3D3 связываются с клетками штаммов обоих возбудителей, то есть демонстрируют родоспецифичность. Моноклональные антитела 2D11, в отличие от МКАт 3D3, не связываются с клетками штаммов P1 *B. mallei* и 100 *B. pseudomallei*, то есть обладают штаммоспецифическим профилем взаимодействия (рис. 2).

В литературе имеются похожие сведения об избирательном взаимодействии МКАт (к капсульному полисахариду возбудителя мелиоидоза) со штаммами *B. pseudomallei* и *B. mallei* [10].

Мы предполагаем, что подобные антитела со штаммоспецифическим профилем при расширении их спектра и совместном использовании с видоспецифической ПЦР-РВ, могут дать дополнительные возможности для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза.

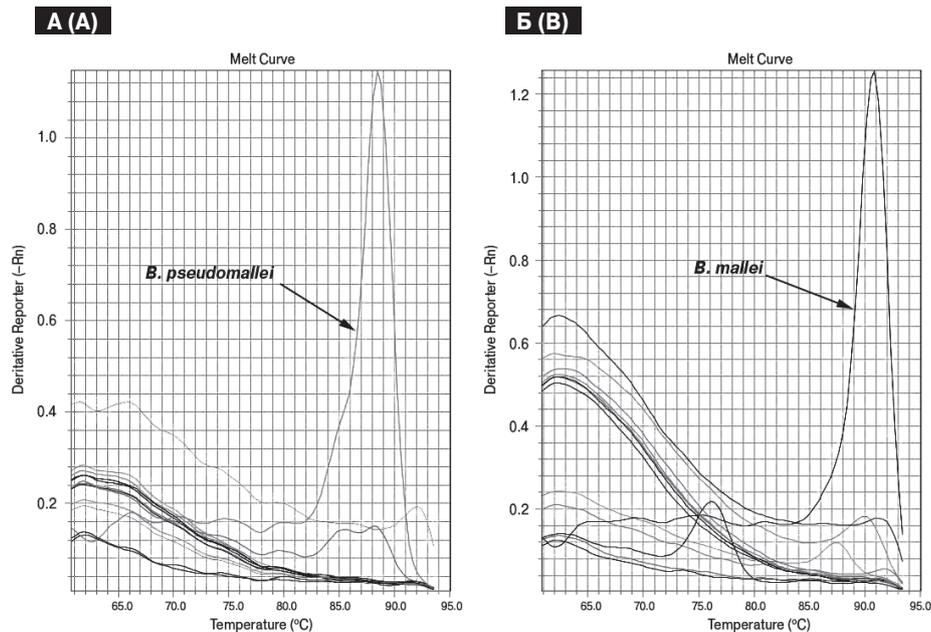


Рисунок 1. Анализ температуры плавления продуктов амплификации после проведения ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green I и праймеров Bma54 (А) и Bp27 (Б)

Figure 1. Analysis of the melting temperature of amplification products after real time-PCR using SYBR Green I and primers Bma54 (A) and Bp27 (B)

А. При определении специфичности праймеров Bma54 к мишени IS407A-flpP использовали следующие штаммы:

B. pseudomallei 100, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427.

Б. При определении специфичности праймеров Bp27 на ген Orf12 области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* использовали следующие штаммы: *B. mallei* C-5, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427.

A. The following strains were used to determine the specificity of the Bma54 primers for the IS407A-flpP target:

B. pseudomallei 100, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126,

B. anthracis STI-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427. B. The following

strains were used to determine the specificity of Bp27 primers for the Orf12 gene of the region TTS1 *B. pseudomallei* gene

cluster: *B. mallei* C-5, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126,

B. anthracis STI-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427.

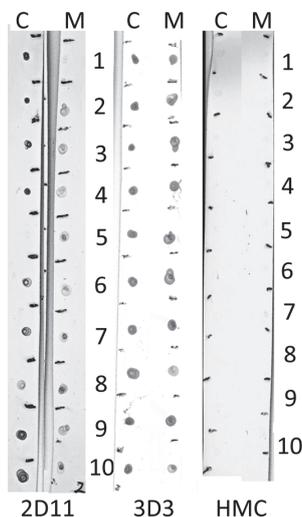


Рисунок 2. Дот-блот МКАт 2D11 и 3D3 с клетками *B. mallei* and *B. pseudomallei*

Figure 2. Dot-blot of Mabs 2D11 and 3D3 with cells of *B. mallei* and *B. pseudomallei*

Примечание. С — штаммы *B. mallei*: 1 — C-4; 2 — C-5;

3 — t-12; 4 — B-120; 5 — P-1; 6 — Muksuwar-11; 7 — Z-12;

8 — Zagreb; 9 — Ivanovich; 10 — 5534. М — штаммы

B. pseudomallei: 1 — 100; 2 — 102; 3 — 115; 4 — 116;

5 — 132; 6 — 135; 7 — 301; 8 — 51274; 9 — 60913; 10 — 61503.

HMC — сыворотка интактной мыши в разведении 1:1000,

МКАт с концентрацией 1 мг/мл в разведении 1:1000.

Note. С — *B. mallei* strains: 1 — C-4; 2 — C-5; 3 — t-12;

4 — B-120; 5 — P-1; 6 — Muksuwar-11; 7 — Z-12; 8 — Zagreb;

9 — Ivanovich; 10 — 5534. М — *B. pseudomallei* strains:

1 — 100; 2 — 102; 3 — 115; 4 — 116; 5 — 132; 6 — 135;

7 — 301; 8 — 51274; 9 — 60913; 10 — 61503. HMC — naive

mouse serum diluted to 1:1000, concentration of Mab 1 mg/ml

diluted to 1:1000.

Список литературы/References

1. Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *B. mallei* и *B. pseudomallei* // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 2 (112). С. 46–50. [Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. Modern approaches for detection of glanders and melioidosis. Identification and typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2012, no. 2 (112), pp. 46–50. (In Russ.)]
2. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): санитарные правила СП 1.3.1285-03. [Safety of work with microorganisms of the I–II pathogenicity (hazard) groups: sanitary rules SP 1.3.1285-03]
3. Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Бондарева О.С., Антонов В.А. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 4. С. 56–59. [Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Development of real-time multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 4, pp. 56–59. (In Russ.)]
4. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569-09. [Organization of work of laboratories using nucleic acid amplification methods when working with a material containing microorganisms of the I–IV pathogenicity groups: guidelines MU 1.3.2569-09.]
5. Федюкина Г.Н., Ветчинин С.С., Баранова Е.В., Рудницкий С.Ю., Соловьев П.В., Колосова Н.В., Бикетов С.Ф. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза // Биотехнология. 2015. № 1. С. 85–93. [Fediukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V., Rudnitskii S.Yu., Soloviov P.V., Kolosova N.V., Biketov S.F. Obtaining of components of immunochromatography test for glanders and melioidosis causes detection. *Biotehnologiya = Biotechnology*, 2015, no. 1, pp. 85–93. (In Russ)].
6. Andersen K., Dargis R., Kemp M., Christensen J.J. Detection of *Burkholderia pseudomallei* by SYBR green real time PCR. *Open Pathol. J.*, 2009, vol. 3, pp. 30–32.
7. Esters D.M., Dow S.W., Schweizer H.P., Torres A.G. Present and future strategies for melioidosis and glanders. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2010, vol. 8, no. 3, pp. 325–338.
8. Foong Y.C., Tan M.R., Bradbury R.S. Melioidosis: a review. *Rural Remote Health.*, 2014, vol. 14, p. 2763.
9. Gregory B.C., Waag D.M. Glanders. In: Medical aspects of biological warfare. Ed. Dembek Z.F. *Washington, DC: Borden Institute Walter Reed Army Medical Center*, 2007, pp. 121–146.
10. Houghton R.L., Reed D.E., Hubbard M.A., Dillon M.J., Chen H., Currie B.J., Mayo M., Sarovich D.S., Theobald V., Limmathurotsakul D., Wongsuvan G., Chantratita N., Peacock S.J., Hoffmaster A.R., Duval B., Brett P.J., Burtnick M.N., Aucoin D.P. Development of a prototype lateral flow immunoassay (LFI) for the rapid diagnosis of melioidosis. *PLOS Neglected Tropical Dis.*, 2014, vol. 8, no. 3, pp. 1–10.
11. Lee M.A., Wang D., Yap E.H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005, vol. 43, pp. 413–417.
12. Lowe W., March J.K., Bannell A.J., O’Neill R.L., Robinson R.A. PCR-based methodologies used to detect and differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. mallei* and *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2013, vol. 22, no. 16 (2), pp. 23–54.
13. Sanford J.P. *Pseudomonas* species (including melioidosis and glanders). In: Principles and practice of infectious diseases. Eds. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. 8th ed. *New York, N.Y.: Churchill Livingstone*, 1995, pp. 2003–2009.
14. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Eickhoff M., Treu T.M., Wernery R., Wernery U., Neubauer H. Development of a 5’-nuclease real-time PCR assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 2, pp. 307–310.
15. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Pitt T.L., Treu T.M., Neubauer H. Development of 5’ nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*/*Burkholderia pseudomallei* complex. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2004, vol. 13, pp. 247–253.

Авторы:

Ветчинин С.С., к.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник сектора Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;

Щит И.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник сектора Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;

Шевяков А.Г., младший научный сотрудник сектора Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;

Бикетов С.Ф., к.б.н., зав. отделом иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия.

Authors:

Vetchinin S.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Leading Researcher, Lime-Borreliosis Sector, Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

Shchit I.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Lime-Borreliosis Sector, Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

Shevyakov A.G., Junior Researcher, Lime-Borreliosis Sector, Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

Biketov S.F., PhD (Biology), Head of the Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.05.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 28.05.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 09.04.2019

ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ АГАР МЮЛЛЕРА–ХИНТОН: СООТВЕТСТВИЕ СОВРЕМЕННЫМ ТРЕБОВАНИЯМ

Л.В. Домотенко, И.С. Косилова, А.П. Шепелин

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

Резюме. Растущая устойчивость возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам (АМП) в настоящее время требует точных результатов тестирования чувствительности возбудителей инфекций к антимикробным препаратам, поскольку ошибки тестирования могут привести к неправильному выбору препаратов для лечения и способствуют распространению резистентности. Наиболее распространенным методом для определения чувствительности патогенов к АМП является диско-диффузионный метод. Критическим фактором, влияющим на результаты тестирования, является качество используемой питательной среды. Ситуация, сложившаяся в нашей стране с наличием двух документов — методических указаний и клинических рекомендаций, регламентирующих методологию определения чувствительности микроорганизмов к АМП, позволила обращаться на отечественном рынке нескольким питательным средам данного назначения — агару Мюллера–Хинтон, среде АГВ и др., не всегда надлежащего качества. С целью гармонизации методологии определения чувствительности к АМП с международными требованиями в ФБУН ГНЦПМБ разработана технология и организовано производство отечественного агара Мюллера–Хинтон, удовлетворяющего современным требованиям документов EUCAST, клинических рекомендаций и ISO/TS 16782:2016. Основной задачей данной работы явилась сравнительная оценка его качества и пяти аналогичных сред иностранных фирм-производителей при исследовании 11 тест-штаммов диско-диффузионным методом. В результате проведенных исследований отмечена нестандартность некоторых из анализированных питательных сред, представленных на рынке РФ: не все исследуемые питательные среды удовлетворяют требованиям нормативных документов EUCAST и клинических рекомендаций, поскольку значения диаметров подавления роста, рекомендуемые EUCAST для контроля качества, не укладываются в допустимые диапазоны. Ошибки обнаружены при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к аминогликозидам, фторхинолонам, меропенему, а также при тестировании *S. aureus* ATCC 25923 и *E. faecalis* ATCC 29212 и тигециклина. Результаты испытаний проанализированы с позиций нового документа ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller–Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing», пока еще не принятого в нашей стране. Для выяснения возможных причин отклонений результатов от нормативных значений определены концентрации двухвалентных металлов во всех исследуемых питательных средах методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. В статье показаны новые закономерности, влияющие на достоверность получаемых результатов тестирования антибиотикочувствительности микроорганизмов. Показана необходимость проведения внутрилабораторного контроля качества питательных сред.

Ключевые слова: питательные среды, агар Мюллера–Хинтон, чувствительность, резистентность, антимикробные препараты, диско-диффузионный метод.

Адрес для переписки:

Домотенко Любовь Викторовна
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,
п. Оболенск, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел./факс: 8 (916) 334-55-26.
E-mail: domotenko@obolensk.org

Contacts:

Lyubov V. Domotenko
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center of Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone/Fax: +7 (916) 334-55-26.
E-mail: domotenko@obolensk.org

Библиографическое описание:

Домотенко Л.В., Косилова И.С., Шепелин А.П. Отечественный агар Мюллера–Хинтон: соответствие современным требованиям // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 409–416. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-409-416

Citation:

Domotenko L.V., Kosilova I.S., Shepelin A.P. Russia-made Mueller–Hinton agar: compliance with contemporary requirements // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 409–416. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-409-416

RUSSIA-MADE MUELLER–HINTON AGAR: COMPLIANCE WITH CONTEMPORARY REQUIREMENTS**Domotenko L.V., Kosilova I.S., Shepelin A.P.***State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation*

Abstract. At present, a rise of antimicrobial resistance requires that susceptibility of infectious agents to antimicrobial agents could be accurately evaluated as related errors may lead to selecting improper therapeutics provoking spread of drug resistance. Pathogen sensitivity to antimicrobial agents is commonly determined by a disc diffusion method. A quality of nutrient medium used in assays plays a crucial role influencing final results. In Russia, it turned out that regulatory documents such as the nationwide guidelines and clinical recommendations outlining methodology for antimicrobial susceptibility testing underlay availability in domestic market few nutrient media, including Mueller–Hinton Agar, AGV medium etc. exhibiting sometimes unsatisfactory quality. To harmonize such methodology with international requirements, the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology has developed a technology and promoted manufacture of Russia-made Mueller–Hinton agar satisfying requirements of EUCAST documents, clinical guidelines, and ISO/TS 16782:2016. The main objective of this study was to compare quality of new agar product with five similar foreign media while examining 11 test strains by disc diffusion method. As a result, some of nutrient media available to the Russian market turned out to be off-standard: not all of them satisfy to the EUCAST requirements and clinical guidelines since diameter distribution for growth inhibition recommended by EUCAST for quality control does not fit into permissible range. Moreover, susceptibility of *P. aeruginosa* ATCC 27853 to aminoglycosides, fluoroquinolones, Meropenem, as well as *S. aureus* ATSS 25923 and *E. faecalis* ATCC 29212 to tigecycline was assessed with certain mistakes. The data obtained by us were analyzed in accordance to the new document ISO/TS 16782:2016 “Clinical laboratory testing — criterion for acceptable lots of dehydrated Mueller–Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing”, not approved yet in Russia. To determine potential reason for deviation of data from reference range, we measured concentration of bivalent metals in all nutrient media examined by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma. We determined new patterns affecting reliability of results on microbial antibiotic susceptibility. A need to check intra-laboratory quality control of nutrient media was emphasized.

Key words: *nutrient media, Mueller–Hinton agar, susceptibility, resistance, antimicrobial agents, disk-diffusion method.*

Введение

Растущая устойчивость возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам в настоящее время — одна из наиболее серьезных проблем здравоохранения во всем мире. Одной из основных задач клинических лабораторий помимо идентификации микроорганизма, вызывающего инфекционное заболевание, является определение чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам (АМП), результаты которого необходимы для назначения наиболее подходящей терапии и принятия мер по предотвращению распространения инфекции. Ошибки при выполнении тестирования чувствительности приводят к неправильному выбору антибиотиков для лечения и способствуют распространению резистентности к антибактериальным препаратам.

Для определения чувствительности патогенов к АМП в клинических микробиологических лабораториях используются различные методы, наиболее распространенным из них остается диско-диффузионный метод (ДДМ). Он подходит для тестирования большинства бактериальных патогенов, в том числе со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует обязательного использования специального обо-

рудования [3, 10]. Точность выполнения метода зависит от четкого соблюдения стандартных требований постановки теста (условий приготовления питательной среды, качества инокулята, качества и стандартности дисков с АМП, условий инокуляции и инкубации и др.). Критическим фактором, влияющим на результаты тестирования, является качество используемой питательной среды.

Ситуация, сложившаяся в нашей стране с наличием двух документов, регламентирующих методологию определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: устаревших, но не утративших юридическую силу методических указаний МУК 4.12.1890-04 и современных клинических рекомендаций, позволила обращаться на отечественном рынке несколькими питательными средами данного назначения — агару Мюллера–Хинтона, среде АГВ и др.

Ранее опубликованы результаты исследований качества различных питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам в соответствии с МУК [4]. Отмечалось, что не все из исследованных питательных сред соответствовали требованиям нормативного документа по содержанию Ca^{2+} и Mg^{2+} , что приводило к заметным отклонениям значений диаметров зон подавления роста *Pseudomonas aeruginosa*

АТСС 27853 вокруг дисков в аминогликозидами и фторхинолонами. Установлено, что ни одна из отечественных питательных сред, включая агар Мюллера–Хинтон, не может быть использована для определения чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидным препаратам из-за высокого содержания тимина и тимидина.

Анализ ситуации с питательными средами в нашей стране и необходимость гармонизации методологии определения чувствительности микроорганизмов к АМП с международными требованиями (рекомендации EUCAST — Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам и CLSI — Института клинических и лабораторных стандартов) подчеркивает актуальность организации производства отечественного стандартизованного агара Мюллера–Хинтон, для которого отсутствовали бы ограничения в использовании. Поэтому цель данной работы — сравнительная оценка качества нового отечественного агара Мюллера–Хинтон, разработанного в соответствии с современными требованиями, и импортных аналогов.

Материалы и методы

В работе исследовали агары Мюллера–Хинтон (МХА) семи фирм-производителей: BD BBL, кат. № 6103881, годен до 01.2020; HiMedia, кат. № M173, годен до 07.2019; BioRad, кат. № 64884, годен до 09.2021; Merck, кат. № 1.05437.0500, годен до 07.2017; BD Difco, кат. № 1073002, годен до 01.2018; ГНЦПМБ Оболенск, РУ № ФСР 2017/5962, годен до 07.2019.

Физико-химические и биологические свойства питательных сред оценивали в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методами контроля бактериологических питательных сред» по следующим показателям: pH, прочность студня агаровых сред по Валенту, чувствительность среды, характер и скорость роста тест-штаммов (контроль роста).

Концентрацию металлов измеряли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) на плазменном спектрометре iCAP-6500 Duo Thermo Scientific (Великобритания).

Определение чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом и интерпретацию результатов проводили в соответствии с актуальными версиями клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам» и документов Европейского комитета по определению чувствительности к antimикробным препаратам (EUCAST).

В работе использовали диски (BD BBL) с antimикробными препаратами, относящимися к разным группам и 11 тест-штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922 и ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и ATCC 51299, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 и ATCC 49247, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70060. Все тест-штаммы получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, LGC Standards).

Результаты

Разработка технологии производства питательной среды. Как известно, питательной основой агара Мюллера–Хинтон является солянокислотный гидролизат казеина (СГК), от качества которого в основном зависит качество питательной среды [11]. Включение в состав агара Мюллера–Хинтон коммерчески доступных СГК, включая технический СГК и технические казаминовые кислоты, не позволило получить питательную среду, удовлетворяющую требованиям клинических рекомендаций. Поэтому была разработана технология производства модифицированного солянокислотного гидролизата казеина специально для данной питательной среды. Разработанный СГК обладает высокой степенью расщепления (70–75%) и следующими характеристиками: pH 7,4–7,5, содержание аминного азота — 4,8–6,6%, хлоридов (в пересчете на натрия хлорид) — 23–34%.

Элементный состав СГК близок к элементному составу Casamino Acid, Technical, используемых в производстве агара Мюллера–Хинтон (табл. 1). Концентрации макроэлементов Na, K, S, Ca, Mg практически одинаковы в сравниваемых

Таблица 1. Концентрации элементов (мг/г) в кислотных гидролизатах казеина

Table 1. Metal ion concentration in casein acid hydrolysate (mg/g)

Гидролизаты Hydrolysate	Na	K	Ca	Mg	S	Mn	Fe	Co	Zn
СГК (Оболенск) Acid hydrolysate (Obolensk)	1536	1,38	0,21	0,08	4,56	0,002	0,019	0,0003	0,005
Casamino Acid, Technical (BD)	1443	1,74	0,19	0,07	4,24	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,02

мых гидролизатах. По содержанию микроэлементов гидролизаты также незначительно отличаются друг от друга.

В ходе исследований отработан процесс получения СГК с минимальным содержанием тимицина и/или тимидина, поскольку их избыток приводит к ложным результатам определения чувствительности *E. faecalis* к сульфаниламидам. Установлены требования к качеству компонентов питательной среды: крахмалу (влажность 7,0–8,0%), мясному экстракту (рН 6,6–7,0) и агару (влажность 3,0–4,0%, рН 7,4–7,6). Использование указанных компонентов с заданными характеристиками позволило получить МХА, удовлетворяющей требованиям современных нормативных документов. Питательная среда обеспечивает рост тест-штаммов с обычными питательными потребностями *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, колонии которых вырастали из разведения 10^{-7} , содержащего примерно 10 КОЕ/мл.

На основании проведенных исследований разработаны технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015) и промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015), а также инструкция

по применению. Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия в Росздравнадзоре.

Сравнительные испытания агаров Мюллера–Хинтона различных фирм-производителей. Для оценки качества разработанной питательной среды проведены сравнительные испытания с агаром Мюллера–Хинтона пяти фирм-производителей диско-диффузионным методом. Сравнительные испытания проводили с использованием 11 контрольных штаммов, предусмотренных документами EUCAST и клиническими рекомендациями для проведения повседневного контроля качества процедуры определения чувствительности. Особое внимание уделяли тест-штаммам, являющимся индикаторами изменения состава питательной среды: *P. aeruginosa* ATCC 27853 — маркер изменения концентрации двухвалентных металлов: кальция (Ca), магния (Mg), цинка (Zn); *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 чувствительны к изменениям уровня марганца; *E. faecalis* ATCC 29212 — индикатор содержания тимицина/тимидина [5].

В таблице 2 приведены данные в оценочных категориях, полученные при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к ами-

Таблица 2. Оценка диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 относительно целевых значений и диапазонов, рекомендованных EUCAST

Table 2. Measuring diameter of growth inhibition zones for *P. aeruginosa* ATCC 27853 vs. target values and ranges recommended by EUCAST

Антимикробные препараты Antimicrobials	Допустимые значения диаметров, рекомендуемые EUCAST для контроля качества, мм EUCAST quality control (QC) range of diameter, mm	Фирмы — производители МХА MHA manufactured by					
	Целевые значения, мм Target values, mm	BD BBL	HiMedia	Bio-Rad	Merck	BD Difco	Оболонск Obolensk
Гентамицин 10 мкг Gentamycin 10 µg	17–23	C	LE	VL	H	C	C
	20						
Тобрамицин 10 мкг Tobramycin 10 µg	20–26	H	LE	L	H	C	C
	23						
Амикацин 30 мкг Amikacin 30 µg	18–26	H	L	L	C	H	C
	22						
Ципрофлоксацин 5 мкг Ciprofloxacin 5 µg	25–33	C	LE	C	VH	C	C
	29						
Имипенем 10 мкг Imipenem 10 µg	20–28	C	C	C	H	C	C
	24						
Меропенем 10 мкг Meropenem 10 µg	27–33	LE	C	L	H	L	L
	30						

Примечание: C — среднее значение находится в пределах ± 1 мм от целевого значения; H = High, среднее значение выше целевого на > 1 мм, но не более 2 мм; L = Low, среднее значение ниже целевого на > 1 мм, но не более 2 мм; VH = Very high, среднее значение выше целевого на > 2 мм, но оно находится в диапазоне допустимых значений; VL (Very low), среднее значение ниже целевого на > 2 мм, но оно находится в диапазоне допустимых значений; LE (Low error), среднее значение меньше нижнего допустимого значения диаметра.

Note: C — means within ± 1 mm of the target value; H = High, means above the target value > 1 mm, range within ± 2 mm of the target value; L = Low, means below the target value > 1 mm, range within ± 2 mm of the target value; VH = Very high, means above target value > 2 mm, fit within the QC range; VL = Very low, means below target value > 2 mm, fit within the QC range; LE = Low error, means out of the QC range towards low values.

ногликозидам, фторхинолонам и карбапенемам — антимикробным препаратам, активность которых зависит от содержания двухвалентных катионов в составе питательной среды.

В соответствии с требованиями клинических рекомендаций и рекомендаций EUCAST питательная среда идеально подходит для определения чувствительности, если значения диаметров подавления роста тест-штаммов вокруг дисков с АМП соответствуют целевым значениям, представляющим собой средние значения интервала допустимых значений. В нашем исследовании отклонения от целевых значений не более чем на ± 1 мм расценивали как незначительные и отмечали как С — корректные, соответствующие целевым значениям.

Отклонения результатов от целевых значений на > 1 , но не более 2 мм, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения отмечали как H (High) или L (Low) соответственно. Отклонения результатов от целевых значений более чем на 2 мм, но находящиеся в рамках допустимых значений, расценивали как значительные и отмечали как VH (Very high) при превышении целевых значений или как VL (Very low) при отклонении результатов в сторону уменьшения целевых значений. Отклонения значений диаметров зон подавления роста, выходящие за рамки верхних или нижних допустимых пределов, расценивали как ошибки и отмечали как HE (High error) или как LE (Low error) соответственно.

Как видно из таблицы, не все исследуемые питательные среды удовлетворяют требованиям нормативных документов. При определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к гентамицину, амикацину и тобрамицину, относящимся к классу аминогликозидных антибиотиков, ошибки в виде отклонений значений диаметров зон подавления роста, выходящие за рамки нижних допустимых пределов, отмечаются в питательной среде производства HiMedia.

При тестировании чувствительности тест-штамма к ципрофлоксацину также наблюдались LE-ошибки на МХА (HiMedia), а на МХА (Merck) регистрировали существенное VH-отклонение.

Определение чувствительности к карбапенемам показало отсутствие ошибок и существенных отклонений от целевых значений при анализе чувствительности к имипенему, а при анализе к меропенему, напротив, выявлена LE-ошибка на МХА (BD BBL).

При тестировании тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 и тигециклина — препарата, активного в отношении полирезистентных патогенов, получены значения диаметров зон подавления роста *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 значительно ниже допустимого диапазона на единственной среде производства Merck.

Как известно, одной из возможных причин отклонений результатов определения чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к аминогликозидам, фторхинолонам, карбапенемам, тетрациклинам от нормативных является ненадлежащий состав питательной среды, связанный с недопустимыми вариациями двухвалентных катионов [2]. Чрезмерное содержание ионов двухвалентных металлов уменьшает размеры зон, тогда как их низкое содержание может привести к неприемлемо большим зонам подавления роста.

Результаты определения элементного состава исследованных МХА представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы, концентрации кальция, магния, цинка и марганца в образцах МХА разных фирм-производителей отличались друг от друга. Наибольшая концентрация кальция обнаружена в МХА (Bio-Rad), а наименьшая — в МХА (Merck). У МХА Merck (HMA) был самый низкий уровень магния, а у МХА (HM) — самая высокая концентрация кальция по сравнению с другими коммерческими МХА. По-видимому, высоким содержанием кальция и магния объясняются LE-ошибки и VL-отклонения при определении чувствительности к аминогликозидам и ципрофлоксацину на МХА (HM) и МХА (Bio-Rad) соответственно.

Представленные в таблице 3 показывают, что концентрация Zn в шести образцах МХА находится ниже значения физиологической концентрации (0,8 мг/л), и только в МХА (BD BBL) превышает физиологическое значение

Таблица 3. Содержание металлов (мг/л) в агарах Мюллера–Хинтон различных производителей

Table 3. Metal ion concentration (mg/L) in Muller–Hinton agars provided by various manufacturers

Металлы Metals	BD BBL	HM	Bio-Rad	Merck	BD Difco	Оболенск Obolensk
Ca	22,0	24,7	30,5	9,4	20,1	21,5
Mg	12,0	27,0	10,0	7,2	9,5	12,3
Zn	1,18	0,61	0,42	0,51	0,65	0,30
Mn	0,02	0,12	0,03	23,02	0,03	0,03
Fe	0,61	0,72	0,46	0,78	0,65	0,23

и составляет 1,18 мг/л. Возможно, высокая концентрация Zn в данной среде приводит к LE-ошибке при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к меропенему.

В нашем исследовании концентрации ионов Mn во всех средах, кроме МХА (Merck), оказались невысокими 0,01–0,12 мг/л. В МХА (Merck) уровень марганца был более чем на 2 порядка выше и составил 23,02 мг/л. Существенным показателем качества агара Мюллера–Хинтона является концентрация тимина и/или тимидина. Наличие в питательной среде свободных тимина и тимидина снижает антимикробную активность *in vitro* антагонистов фолиевой кислоты — сульфаниламидных препаратов. Поэтому при определении чувствительности к сульфаниламидам и триметоприму используемые питательные среды должны содержать минимальные концентрации или не содержать вообще тимидина и тимина. Согласно требованиям нормативных документов, среда считается удовлетворительной по качеству, если значения диаметров зоны подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом находятся в диапазоне 26–34 мм. В проведенном исследовании зоны подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 на всех средах соответствовали нормативным требованиям.

Обсуждение

Увеличение числа инфекций, вызванных устойчивыми к антимикробным препаратам микроорганизмами, требует знания точных результатов определения чувствительности возбудителя для выбора антибиотика в терапевтической схеме лечения. Самый доступный и широко распространенный метод определения чувствительности к антимикробным препаратам — диско-диффузионный метод — позволяет получать воспроизводимые результаты при условии использования качественной питательной среды. За 5 лет, прошедших с момента опубликования статьи, посвященной оценке качества обрабатываемых на российском рынке питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам, произошли некоторые изменения. Эти изменения связаны с принятием новых клинических рекомендаций, разрешающих использование единственной питательной среды данного назначения — агара Мюллера–Хинтон, и с появлением на российском рынке МХА других фирм-производителей. Но, к сожалению, сохранилась ситуация с нестандартностью питательных сред. До сих пор на рынке представлена нестандартизованная среда АГВ, качество которой описано в других публикациях [3, 4].

Для обеспечения получения надежных результатов необходимо, чтобы концентрации катионов металлов в средах Мюллера–Хинтона соответствовали рекомендованным значениям, так как высокие или низкие значения могут привести к ложной устойчивости или ложной чувствительности соответственно. Следует отметить, только в МУК 4.12.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» содержатся конкретные требования к содержанию кальция и магния в средах для диско-диффузионного метода — 20–25 и 10–12,5 мг/л соответственно [1]. В клинических рекомендациях и стандартах EUCAST требования к физико-химическим показателям качества питательных сред, за исключением величины pH, вообще отсутствуют.

Если проследить эволюцию международных требований к содержанию Ca и Mg в составе МХА, то вначале это было 100 и 50 мг/л соответственно; затем 50 и 25 мг/л соответственно; далее — 20–25 и 10–12,5 мг/л соответственно. В конце 2016 г. международной организацией по стандартизации (ISO) разработан новый международный стандарт и технические условия ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller–Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing», который содержит описание физико-химических свойств и критерии оценки эффективности дегидратированных агара и бульона Мюллера–Хинтон, пригодных для тестирования чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

В новом документе ISO/TS 16782:2016 не обозначены конкретные требования по содержанию кальция и магния, лишь указано, что агар Мюллера–Хинтон должен иметь, такие концентрации ионов Ca и Mg, чтобы полученные значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* WDCM 00025 вокруг дисков с гентамицином находились в пределах допустимого диапазона.

Концентрации кальция и магния, измеренные в МХА в нашем исследовании, отличались между собой, а для четырех МХА не соответствовали требованиям МУК 4.12.1890-04. Возможно, высокие концентрации магния в МХА (НМ) и кальция в МХА (Bio-Rad) явились причиной LE-ошибок и VL-отклонений при тестировании чувствительности к аминогликозидам и фторхинолонам, а низкие значения концентраций указанных двухвалентных металлов в МХА (Merck) приводили к H-отклонениям.

Информацию о влиянии уровня цинка и марганца в среде МХА на результаты чувствительности к таким антимикробным препаратам, как глицилциклины, к которым от-

носятся тигециклин, и карбапенемы, до появления ISO/TS 16782:2016 можно было найти только в отдельных публикациях [6–9, 12–13]. В документах EUCAST и клинических рекомендациях, указано, что тигециклин способен выявлять недопустимые вариации содержания не марганца, а магния в составе питательной среды. В документе ISO/TS 16782:2016 обозначены допустимые значения концентраций цинка и марганца в МХА: для цинка — ниже 3 мг/л и для марганца — ниже 8 мг/л.

Как показали наши исследования, концентрация Mn в МХА (Merck) оказалась значительно выше допустимого значения, что, вероятно, и привело к низким значениям диаметров зон подавления роста для *S. aureus* ATCC 25923 (17 ± 1 мм) и *E. faecalis* ATCC 29212 (17 ± 1 мм) вокруг дисков с тигециклином, которые не укладывались требуемый диапазон значений: 19–25 мм и 20–26 мм, соответственно. Результаты тестирования еще одного тест-штамма *E. coli* ATCC 25922, рекомендованного ISO/TS 16782:2016 для определения пригодности МХА для работы с тигециклином, напротив, находились в требуемом диапазоне и составили 21 ± 1 мм при норме 20–27 мм. Полученные данные согласуются с результатами исследований испанских исследователей, которые показали, что из-за высокой концентрации марганца в среде фирмы Merck значения МПК для тигециклина, определенные с помощью E-test, значительно отличались от результатов, полученных на МХА (Difco) [12].

По содержанию цинка исследованные питательные среды соответствовали требованиям ISO/TS 16782:2016, однако на МХА (BD BBL) при концентрации цинка 1,18 мг/л обнаружены LE-ошибки при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к меропенему.

Результаты, полученные в данном исследовании, подтверждают важность стандартизации методологии оценки пригодности питательных сред при исследовании чувствительности *in vitro* в отношении не только Ca, Mg, но и Zn,

Mn, необходимость которой неоднократно обсуждалась в публикациях. В стандарте ISO/TS 16782:2016 на основании анализа публикаций приведены допустимые концентрации всех четырех металлов в бульоне Мюллера–Хинтон (МХБ), а в МХА только цинка и марганца. Для МХБ появились требования к производителям обязательно указывать точные концентрации катионов в каждой серии. Жаль, что русскоязычный аналог этого документа в виде ГОСТа пока не существует, и российским производителям приходится обращаться за информацией либо к разрозненным научным публикациям, либо к данному документу, не находящемуся даже в свободном доступе.

Несмотря на принятие нового стандарта ISO, с микробиологических лабораторий не снимается необходимость проведения входного контроля каждой новой серии питательной среды с обязательным использованием дисков с АМП, находящимися в работе.

Как показали результаты настоящего исследования только четыре из шести проанализированных МХА удовлетворяют требованиям нормативных документов в отношении тестирования чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидным препаратам, аминогликозидам, фторхинолонам и даже к карбапенемам. В этом списке находится и недавно зарегистрированный МХА (Оболенск).

Конечно, переход лабораторий страны к использованию агара Мюллера–Хинтон — это требование времени, и выбирая МХА, важно использовать питательную среду надлежащего качества, отвечающую всем требованиям современных нормативных документов.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность Колотову В.П. и сотрудникам ФГБУН Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН за помощь в определении содержания металлов в питательных средах.

Список литературы/References

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания (МУК 4.12.1890-04). М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с. [Antibacterial susceptibility testing: Guidelines (МУК 4.12.1890-04). Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health, 2004, 91 p. (In Russ.)]
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. 206 с. Версия 2018-03. [Antimicrobial susceptibility testing. Clinical recommendations. 206 p. Version 2018-03]. URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> (22.05.2019)
3. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 4. С. 348–354. [Reshedko G.K., Stetsyuk O.U. Features of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion method. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, no. 4, pp. 348–354. (In Russ.)]
4. Шепелин А.П., Морозова Т.П., Косилова И.С., Глазкова Г.П., Домотенко Л.В. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам // Дезинфекция. Антисептика. 2013. № 1. С. 43–48.

- [Shepelin A.P., Morozova T.P., Kosilova I.S., Glazkova G.P., Domotenko L.V. The assessment of quality of nutrient media for determination of sensitivity to antimicrobial preparations. *Desinfekciya. Antiseptika = Disinfection. Antiseptic*, 2013, no. 1, pp. 43–48. (In Russ.)]
5. Andrews J., Walker R., King A. Evaluation of media available for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by BSAC methodology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, vol. 50, no. 4, pp. 479–486.
 6. Cooke P., Heritage J., Kerr K., Hawkey P.M. Kenneth E. Different effects of zinc ions on in vitro susceptibilities of *Stenotrophomonas maltophilia* to Imipenem and Meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, vol. 40, no. 12, pp. 2909–2910.
 7. Daly J.S., Dodge R.A., Glew R.H., Soja D.T., Deluca B.A., Hebert S. Effect of zinc concentration in Mueller-Hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 4, pp. 1027–1029.
 8. Fernandez-Mazarrasa C., Mazarrasa O., Calvo J., del Arco A., Martínez-Martínez L.J. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 3, pp. 827–829.
 9. Girardello P.J., Bispo M., Yamanaka T.M., Galesa A.C. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 7, pp. 2414–2418.
 10. Matuschek E., Brown D.F.J., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, no. 4, pp. 255–266.
 11. Mueller J.H., Hinton J. A protein-free medium for isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, vol. 48, no. 1, pp. 330–333.
 12. Thamlikitkul V., Tiengrim S. Effect of different Mueller–Hinton agars on tigecycline disc diffusion susceptibility for *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, vol. 62, no. 4, pp. 847–848.
 13. Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A.J.W., Donnelly R., Verhulst C., van Keulen P.H.J. Effect of manganese in test media on in vitro susceptibility of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 9, pp. 3077–3079.

Авторы:

Домотенко Л.В., к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Косилова И.С., младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред, п. Оболensk, Россия;

Шепелин А.П., д.б.н., зам. директора по научно-производственной деятельности ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия.

Authors:

Domotenko L.V., PhD (Chemistry), Leading Researcher, Nutrient Media Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Kosilova I.S., Junior Researcher, Nutrient Media Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Shepelin A.P., PhD, MD (Biology), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.06.2018
Отправлена на доработку 22.03.2019
Принята к печати 26.03.2019

Received 23.06.2018
Revision received 22.03.2019
Accepted 26.03.2019

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

Алаторцева Г.И.	381	Гусева Н.П.	393	Ляпун И.Н.	369	Старшинова А.А.	304
Аронова Н.В.	262	Даниелян Т.Ю.	347	Мжельская Т.В.	337	Талаев В.Ю.	295
Бабайкина О.Н.	295	Домотенко Л.В.	409	Микшис Н.И.	315	Талаева М.В.	295
Барышникова Н.В.	363	Драгомерецкая А.Г.	337	Мионова Р.И.	262	Терещенко С.Ю.	229
Басанцова Н.Ю.	304	Дробот Е.И.	369	Мокриевич А.Н.	262	Титарева Г.М.	262
Басов А.А.	354	Заиченко И.Е.	295	Неумоина Н.В.	295	Троценко О.Е.	337
Бахлыкова Е.А.	363	Зарифьян Д.Н.	279	Николенко М.В.	363	Уткин Д.В.	393
Бахтеева И.В.	262	Зекореева А.Х.	354	Нурматов З.Ш.	381	Фирстова В.В.	262
Баюрова Е.О.	279	Зинченко Ю.С.	304	Олейник Е.А.	239	Цвиркун О.В.	354
Беляева Е.Н.	304	Зыкова А.В.	363	Осина Н.А.	393	Черных Е.Р.	239
Бикетов С.Ф.	404	Игнатъева М.Е.	337	Останин А.А.	239	Чистяков Д.С.	279
Брезгин С.А.	279	Ильина Н.И.	325	Павлова М.В.	304	Чуланов В.П.	279
Бугоркова С.А.	315	Каплун Г.А.	393	Павлович Н.В.	262	Шайхутдинова Р.З.	262
Будацыренова Л.В.	337	Карпунина Т.И.	347	Пахомов Д.В.	325	Шалатова О.Ю.	385
Вавилов Н.В.	347	Киреев М.Н.	393	Перфилова К.М.	295	Шевяков А.Г.	404
Валеева Ю.В.	253	Клюева С.Н.	315	Плехова Н.Г.	369	Шепелин А.П.	409
Василенко И.А.	385	Кожухова Е.А.	375	Погарская И.В.	381	Шубин Ф.Н.	369
Ветчинин С.С.	404	Комбарова Т.И.	262	Поздеев О.К.	253	Щербакова С.А.	315
Волков А.Ю.	385	Контаров Н.А.	381	Поздеева А.О.	253	Щит И.Ю.	404
Волчкова Е.В.	279	Косилова И.С.	409	Романова А.П.	337	Щуковская Т.Н.	315
Воронина Е.В.	295	Костинов М.П.	325	Романченко К.В.	363	Юминова Н.В.	381
Гегечкори В.И.	279	Костюшев Д.С.	279	Русанова Е.В.	385	Яблонский П.К.	304
Герасимова А.Г.	354	Костюшева А.П.	279	Савинова А.Н.	253	Egofeeva M.K.	273
Годвалов А.П.	347	Кравченко Л.В.	288	Садртдинова Г.Р.	399	Lyovina A.V.	273
Гончарова А.Ю.	315	Кравченко Т.Б.	262	Семанин А.Г.	399	Petlenko S.V.	273
Горбатов А.А.	262	Кудрявцев И.В.	304	Серебрякова М.К.	304	Redlich G.	273
Горбова И.В.	375	Кудрявцева О.М.	315	Смольникова М.В.	229	Savelyev S.A.	273
Григорьева В.И.	337	Куклев В.Е.	393	Снегова Н.Ф.	325	Smirnov V.S.	273
Гуляев П.Е.	253	Леплина О.Ю.	239	Сомова Л.М.	369	Zaviyalova N.I.	273
Гурьев А.С.	385	Лухверчик Л.Н.	381	Старостина Н.М.	239		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

агар Муллера–Хинтон	409	когерентная флуктуационная		рецепторы хемокинов	295
адаптивный иммунитет	239	нефелометрия	385	рожденные ВИЧ-инфицированными	325
акрофаза	363	коклюш	354	матерями	325
амплитудно-фазовые		кольцевая ковалентно замкнутая ДНК	279	сап	404
характеристики	363	корь	325	скрининг	385
антигены	393	культуральный метод	375	специфическая профилактика чумы	315
антимикробные препараты	409	лимфоциты	288	специфические антитела	262
антитела	393	липополисахарид <i>F. novicida</i>	262	специфичность	279
ассоциация энтеропатогенов	375	липополисахарид <i>F. tularensis</i>	262	Т-клеточный ответ	239
бактерии	399	литическая активность	399	Т-лимфоциты	295
бактериофаги	399	математическая модель	381	туберкулез	304
бактериурия	385	мезор	363	Т-хелперы 17	304
безжелтушная форма гепатита Е	381	мелиоидоз	404	фолликулярные Т-хелперы	304
белки	347	метод	399	хемокиновые рецепторы	304
бесклеточные вакцины	354	микробиологический анализатор	385	цитокины	253
биопип	393	микросимбионты	363	цитомегаловирусная инфекция	288
вакцина	325	микрофлора	347	чувствительность	409
вакцинация	325	модифицированные		чума	393
вирус гепатита В	279	РНК-проводники	279	экспериментальная туляремия	262
ВИЧ-инфекция	325	молекулы костимуляции	288	эпителиоциты слизистой оболочки	
внецелевые эффекты	279	моноклональные антитела	404	желудка	253
воспаление	347, 369	морфология	399	эффективность	279
время удвоения инфекции	381	моча	385	эхографическое исследование	347
врожденный иммунитет	229, 239	напряженность иммунитета	337	эякулят	347
выделение	399	неэндемичная территория	337	язвенная болезнь	295
гастрит	295	новорожденные	288	Arbidol	273
гепатит Е	381	норовирус	375	ARVI	273
дальневосточная скарлатиноподобная		определение чувствительности		<i>Candida albicans</i>	363
лихорадка	369	к антибиотикам	385	CD3 ⁺ CD4 ⁺ центральной памяти	304
дендритные клетки	239	острая диарея	375	children	273
дети	229, 325	паттерн-распознающие рецепторы	229	CRISPR/Cas9	279
дисбиоз	363	передаточное число	381	Cytovir-3	273
диско-диффузионный метод	409	переносчики возбудителя	337	DC вакцины	239
дот-блот	404	питательные среды	409	HCV-антигены	239
дюдоденит	295	плазмидные типы	369	HCV-инфекция	239
желтушная форма гепатита Е	381	пневмококковая инфекция	229	<i>Helicobacter pylori</i>	253
заболеваемость	354	полиморфизм генов HLA	315	mDC	239
иммунизация	354	популяция	381	mo-DC	239
иммунитет	393	предстательная железа	347	О-антиген	262
иммунологическая эффективность	315	псевдотуберкулез	369	pDC	239
иммуносупрессия	369	ПЦР-метод	375	preventive medication	273
ИФА-метод	375	ПЦР-РВ	404	prophylaxis	273
календарь прививок	354	ревакцинация	354	sIgA	273
клетки врожденного иммунитета	369	резистентность	409	Th17.1	304
клещевой вирусный энцефалит	337	Республика Саха (Якутия)	337	Toll-подобные рецепторы	229
				<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	369

Иллюстрации к статье «Роль нарушений активации Т-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса» (автор: Л.В. Кравченко) (с. 288–294)

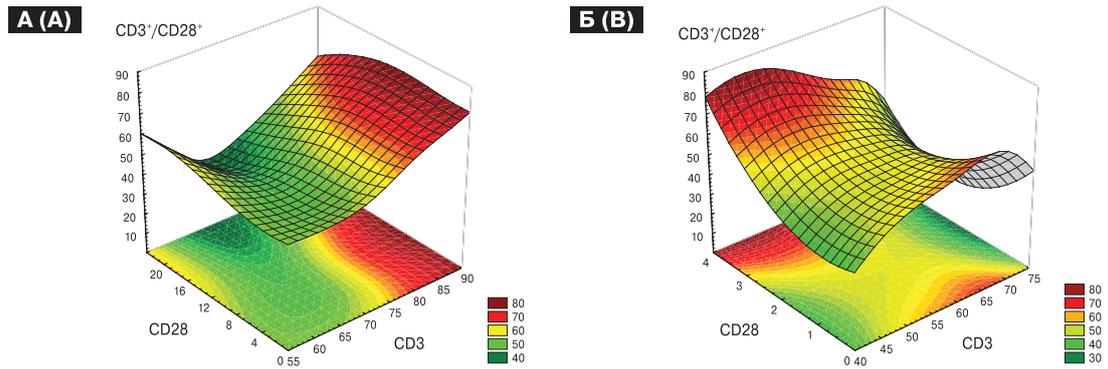


Рисунок 1. Зависимость уровня субпопуляций Т-лимфоцитов с рецепторами $CD3^+CD28^+$ от уровня Т-лимфоцитов с рецепторами $CD3$, $CD28$ у детей с ЦМВИ

Figure 1. Dependence of the level of subpopulations of T-lymphocytes with $CD3^+CD28^+$ receptors on the level of T-lymphocytes with $CD3$, $CD28$ receptors in children with CMV infection

A. Позднее обнаружение ДНК ЦМВ (основная группа). Б. Раннее выявление ДНК ЦМВ (контрольная группа).
A. Late detection of CMV DNA (the main group). B. Early detection of CMV DNA (control group).

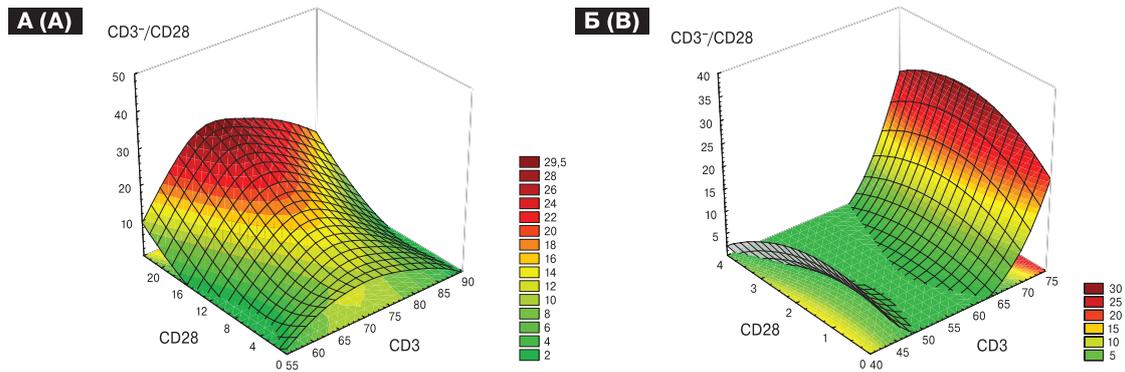


Рисунок 2. Зависимость уровня Т-лимфоцитов с рецепторами $CD3^-CD28$ от уровня Т-лимфоцитов с рецепторами $CD3$, $CD28$ у детей с ЦМВИ

Figure 2. Dependence of level of T-lymphocytes with $CD3^-CD28$ receptors from the level of T-lymphocytes with receptors of $CD3$, $CD28$ in children with CMV infection

A. Позднее обнаружение ДНК ЦМВ (основная группа). Б. Раннее выявление ДНК ЦМВ (контрольная группа).
A. Late detection of CMV DNA (the main group). B. Early detection of CMV DNA (control group).

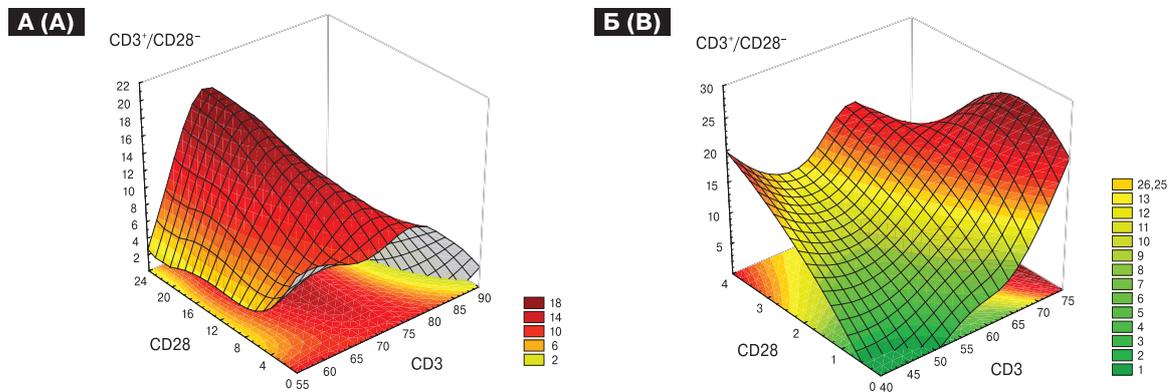


Рисунок 3. Зависимость уровня Т-лимфоцитов с рецепторами $CD3^+CD28^-$ от уровня Т-лимфоцитов с рецепторами $CD3$, $CD28$ у детей с ЦМВИ

Figure 3. Dependence of level of T-lymphocytes with receptors of $CD3^+CD28^-$ from the level of T-lymphocytes with receptors of $CD3$, $CD28$ in children with CMV infection

A. Позднее обнаружение ДНК ЦМВ (основная группа). Б. Раннее выявление ДНК ЦМВ (контрольная группа).
A. Late detection of CMV DNA (the main group). B. Early detection of CMV DNA (control group).

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

