

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

октябрь–декабрь
2019, том 9

№ 5–6

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

Главный редактор

Тотоян Арег А. д.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
Тотоян Артем А. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
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 20.12.2019 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1019

© 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)

October–December

2019, volume 9

No. 5–6

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 Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
- Ilija I. Dolgushin** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
- Vitaly V. Zverev** PhD, MD (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation, Director; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
- Ludmila P. Zueva** PhD, MD (Medicine), Professor, I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, St. Petersburg, Russian Federation
- Lidiia A. Kaftyreva** PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
- Kirill P. Kashkin** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
- Olga I. Kubar** PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Victor V. Maleev** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, 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 20.12.2019. 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

Козлов В.А.

СЕЛЕКЦИЯ КЛЕТОК В ТИМУСЕ И ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК НА ПЕРИФЕРИИ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ 629

Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А.

СОВРЕМЕННОЕ ПОНИМАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ТОКСИНОВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ПОДХОДЫ К БЛОКИРОВАНИЮ ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 639

Оригинальные статьи

Сиволодский Е.П., Фрейлихман О.А.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA MICHIGANENSIS* 648

Петрова П.А., Коновалова Н.И., Васильева А.Д., Еропкина Е.М., Иванова А.А., Комиссаров А.Б., Еропкин М.Ю., Даниленко Д.М.

ОСОБЕННОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2) ЧЕЛОВЕКА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ПЕРИОД 2016–2018 ГГ. 655

Савова Т., Петрова Р., Вылчева В., Боновска М., Найденски Х.

ВЫДЕЛЕНИЕ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ИЗ МУФЛОНА В БОЛГАРИИ 665

Тапальский Д.В., Савченко О.И., Бонда Н.А.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* — ПРОДУЦЕНТОВ КАРБАПЕНЕМАЗ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ БЕЛАРУСИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ, ДЕЗИНФЕКТАНТАМ 671

Зарипова А.З., Тюрин Ю.А., Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Исаева Г.Ш.

IgA-ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ДЕТЕЙ-БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ 680

Парилова О.В., Капустина Т.А., Маркина А.Н., Белова Е.В.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСИТА, СОПРЯЖЕННОГО С ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ 687

Запорожец Т.С., Сокотун С.А., Симакова А.И., Персиянова Е.В.

КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ 695

Мошникова А.Н., Максимчук В.К., Лапин С.В., Назаров В.Д., Суркова Е.А., Новиков С.А., Макшаков Г.С., Крутецкая И.Ю., Краснов В.С., Кушнир Я.Б., Неофидов Н.А., Тотолян Н.А., Скоромец А.А., Евдошенко Е.П., Тотолян Арег А.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИНТРАТЕКАЛЬНОГО СИНТЕЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРОТИВ НЕЙРОТРОПНЫХ ВИРУСОВ (MRZ-РЕАКЦИЯ) В ДИАГНОСТИКЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА 703

Коровкина Е.С., Краковская А.В., Костинов М.П., Козлов В.К., Ястребова Н.Е., Магаршак О.О., Полищук В.Б.

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ IgM И IgG К КОМПЛЕКСУ ПОЛИСАХАРИДОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ *S. PNEUMONIAE* И *H. INFLUENZAE* ТИПА В У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ И БРОНХОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАМИ «ПНЕВМО-23» И «АКТ-ХИБ» 713

Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Князев Д.И., Преснякова Н.Б.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ мРНК ОСНОВНЫХ УЧАСТНИКОВ СИГНАЛИНГА АПОПТОЗА И ВЫЖИВАНИЯ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ВЭБ-ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОУКЛЕОЗОМ 723

Дрыгина Л.Б., Дорофейчик-Дрыгина Н.А.

ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА И ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ У МОЛОДЫХ МУЖЧИН ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ, АССОЦИИРОВАННОМ С *HELICOBACTER PYLORI* 735

Негоденко А.О., Лучинин Д.Н., Коновалов П.Ш., Павлюкова О.А., Скрынникова Е.А., Прилепская Д.Р., Молчанова Е.В., Баркова И.А., Викторов Д.В., Топорков А.В.

**СКРИНИНГ МАРКЕРОВ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК КРОВИ
ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ 743**

Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Лейнсоо А.Т., Грядунов Д.А., Петрова Н.П., Честков А.В., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г.

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП ДЛЯ АНАЛИЗА УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕТРАЦИКЛИНУ КЛИНИЧЕСКИХ
ИЗОЛЯТОВ *NEISSERIA GONORRHOEA* В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ 750**

Кривицкая В.Э., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г., Кадырова Р.А., Львов Н.И., Го А.А., Соминина А.А.

**РЕАКЦИЯ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ В СРАВНЕНИИ С РЕАКЦИЕЙ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ
ПРИ ОЦЕНКЕ ИММУНОГЕННОСТИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН И ДИАГНОСТИКЕ ГРИППА 763**

Содья Э., Топлак Н., Корен С., Ковач М., Труден С., Жолнир-Довч М.

**СЕКВЕНИРОВАНИЕ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОУСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ
Mycobacterium tuberculosis В СТРАНАХ С НИЗКИМ УРОВНЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ 773**

Галина Н.П., Миндлина А.Я., Полибин Р.В.

**АНАЛИЗ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИВИВОК ДЕТСКОГО И ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ РФ ПРОТИВ ДИФТЕРИИ,
СТОЛБНЯКА, КОРИ И ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В 779**

Азовцева О.В., Пантелеев А.М., Карпов А.В., Архипов Г.С., Вебер В.Р., Беляков Н.А., Архипова Е.И.

**АНАЛИЗ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ФОРМИРОВАНИЕ И ТЕЧЕНИЕ
КОИНФЕКЦИИ ВИЧ, ТУБЕРКУЛЕЗА И ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА 787**

Краткие сообщения

Петровская М.С., Кричевская Г.И., Денисова Е.В., Катаргина Л.А., Куликова И.Г.

**ЗНАЧЕНИЕ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ
С ЭНДОГЕННЫМИ УВЕИТАМИ 800**

Мухина А.Ю., Медведева О.А., Свищева М.В., Шевченко А.В., Ефремова Н.Н., Бобынцев И.И., Калущий П.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО
ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СЕЛАНКА 805**

Тронин А.А., Токаревич Н.К., Гнатив Б.Р.

**ЧИСЛЕННОСТЬ КЛЕЩЕЙ *Ixodes persulcatus* В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ КАК ФУНКЦИЯ
ТЕМПЕРАТУРЫ ВОЗДУХА 811**

Юбилей

К 90-ЛЕТИЮ АЛЕКСАНДРА АНАТОЛЬЕВИЧА СМОРОДИНЦЕВА 817

Правила для авторов 819

Авторский указатель 822

Предметный указатель 822

CONTENTS

Reviews

Kozlov V.A.

T CELL THYMIC SELECTION AND PERIPHERAL HOMEOSTATIC PROLIFERATION IN INFECTIOUS DISEASES 629

Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A.

CURRENT UNDERSTANDING OF *BACILLUS ANTHRACIS* TOXIN MOLECULES ORGANIZATION AND APPROACHES FOR BLOCKING THEIR CYTOTOXIC ACTION 639

Original articles

Sivolodskii E.P., Freylikhman O.A.

GENETIC AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *KLEBSIELLA MICHIGANENSIS* ISOLATES 648

Petrova P.A., Konovalova N.I., Vassilieva A.D., Eroпкиna E.M., Ivanova A.A., Komissarov A.B., Eroпкиn M.Yu., Danilenko D.M.

FEATURES 2016–2018 CURRENT HUMAN INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES CIRCULATING IN RUSSIA 655

Savova T., Petrova R., Valcheva V., Bonovska M., Najdenski H.

ISOLATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *PARATUBERCULOSIS* FROM MOUFLON IN BULGARIA 665

Tapalski D.V., Savchenko O.I., Bonda N.A.

PREVALENCE OF CARBAPENEMASE-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN GOMEL REGION OF BELARUS AND THEIR SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS, ANTIBIOTIC COMBINATIONS, AND DECONTAMINANTS 671

Zaripova A.Z., Tyurin Yu.A., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Isaeva G.Sh.

IgA-PROTEASE ACTIVITY COUPLED TO CELLULAR ENZYMES OF DIFFERENT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTYPES ISOLATED IN PEDIATRIC BACTERIA CARRIERS 680

Parilova O.V., Kapustina T.A., Markina A.N., Belova E.V.

CHARACTERISTICS OF IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH ACUTE CHRONIC MAXILLARY SINUSITIS ASSOCIATED WITH INTRA-CELLULAR BACTERIAL INFECTIONS 687

Zaporozhets T.S., Sokotun S.A., Simakova A.I., Persiyanova E.V.

CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN CONVALESCENTS FROM IXODES TICK-BORNE BORRELIOSIS 695

Moshnikova A.N., Maksimchuk V.K., Lapin S.V., Nazarov V.D., Surkova E.A., Novikov S.A., Makshakov G.S., Krutetskaya I.Yu., Krasnov V.S., Kushnir Ya.B., Neofidov N.A., Totolian N.A., Skoromets A.A., Evdoshenko E.P., Totolian Areg A.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INTRATHECALLY SYNTHESIZED IMMUNOGLOBULINS AGAINST NEUROTROPIC VIRUSES (MRZ-REACTION) IN DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS 703

Korovkina E.S., Krakovskaya A.V., Kostinov M.P., Kozlov V.K., Jastrebova N.E., Magarshak O.O., Polishchuk V.B.

DYNAMICS IN IgM AND IgG ANTIBODIES AGAINST A POLYSACCHARIDE CAPSULE-CONTAINING COMPLEX OF VARIOUS *S. PNEUMONIAE* AND *H. INFLUENZAE* TYPE B SEROTYPES IN CHILDREN WITH CHRONIC LUNG AND BRONCHIAL INFLAMMATORY DISEASES AFTER VACCINATION WITH “PNEUMO-23” AND “ACT-HIB” 713

Sakharnov N.A., Utkin O.V., Filatova E.N., Knyazev D.I., Presnyakova N.B.

APOPTOSIS- AND SURVIVAL-RELATED GENE mRNA PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE EBV INFECTIOUS MONONUCLEOSIS 723

Drygina L.B., Dorofeytchik-Drygina N.A.

PARAMETERS OF MINERAL METABOLISM AND BONE DENSITY IN YOUNG MALES WITH *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED CHRONIC GASTRITIS 735

Negodenkova A.O., Luchinin D.N., Konovalov P.Sh., Pavlyukova O.A., Skrynnikova E.A., Prilepskaya D.R., Molchanova E.V., Barkova I.A., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

A SCREENING FOR SERUM MARKERS OF ARBOVIRUS INFECTIONS IN HEALTHY BLOOD DONORS FROM THE VOLGOGRAD REGION 743

Dementieva E.I., Shaskolskiy B.L., Leinsoo A.T., Gryadunov D.A., Petrova N.P., Chestkov A.V., Kubanov A.A., Deryabin D.G.

BIOLOGICAL MICROCHIP FOR ASSESSING TETRACYCLINE-RESISTANCE IN NEISSERIA GONORRHOEAE CLINICAL ISOLATES IN RUSSIAN FEDERATION 750

Krivitskaya V.Z., Kuznecova E.V., Majorova V.G., Kadyrova R.A., Lvov N.I., Go A.A., Somnina A.A.

MICRONEUTRALIZATION REACTION COMPARED TO HEMAGGLUTINATION INHIBITION ASSAY TO EVALUATE IMMUNOGENICITY OF INFLUENZA VACCINES AND INFLUENZA DIAGNOSTICS 763

Sodja E., Toplak N., Koren S., Kovač M., Truden S., Žolnir-Dovč M.

NEXT-GENERATION SEQUENCING OF DRUG RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES IN LOW-INCIDENCE COUNTRIES 773

Galina N.P., Mindlina A.Ya., Polibin R.V.

SURVEYING CHILDREN AND ADULT VACCINATION PROGRAM AGAINST DIPHTHERIA, TETANUS, MEASLES AND VIRAL HEPATITIS B IN THE RUSSIAN FEDERATION 779

Azovtzeva O.V., Panteleev A.M., Karpov A.V., Arkhipov G.S., Weber V.R., Belyakov N.A., Arkhipov E.I.

ANALYSIS OF MEDICAL AND SOCIAL FACTORS AFFECTING THE FORMATION AND COURSE OF CO-INFECTION HIV, TUBERCULOSIS AND VIRAL HEPATITIS 787

Short communications

Petrovskaya M.S., Krichevskaya G.I., Denisova E.V., Katargina L.A., Kulkova I.G.

IMPORTANCE OF EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION IN PATHOGENESIS OF PROLIFERATIVE COMPLICATIONS IN CHILDREN WITH ENDOGENOUS UVEITIS 800

Mukhina A.Yu., Medvedeva O.A., Svishcheva M.V., Shevchenko A.V., Efremova N.N., Bobyntsev I.I., Kalutsky P.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F.

STATE OF RAT COLON MICROBIOCENOSIS IN CHRONIC RESTRAINT STRESS TREATED WITH SELANK 805

Tronin A.A., Tokarevich N.K., Gnativ B.R.

ABUNDANCE OF IXODES PERSULCATUS TICKS IN KOMI REPUBLIC AS A FUNCTION OF AN AIR TEMPERATURE 811

Jubilee

FOR THE ANNIVERSARY OF PROFESSOR ALEKSANDR A. SMORODINCEV 817

Instructions to Authors 819

Author index 822

Subject index 822

СЕЛЕКЦИЯ КЛЕТОК В ТИМУСЕ И ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК НА ПЕРИФЕРИИ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ

В.А. Козлов^{1,2}

¹ ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Несомненно, что взаимодействия между инфекционными агентами и макроорганизмом носят сложный, до конца еще не изученный характер. Это в первую очередь касается механизмов хронизации инфекционного процесса. Острая инфекция протекает с характеристиками первичного иммунного ответа с проявлением всех его классических фаз, каждая из которых проявляется в виде стадий клинической картины данной конкретной инфекции, со спецификой начала заболевания и последующего выздоровления. Весь процесс формирования иммунного ответа к инфекционному агенту протекает в периферических лимфоидных органах и тканях иммунной системы. В отношении участия иммунной системы в инфекционном процессе, ее роли в данном процессе, остаются, по-видимому, два основных нерешенных вопроса. Каковы механизмы гибели организма в случае острого инфекционного процесса? В чем здесь «вина» иммунной системы? В ее неполноценности или в резком подавлении ее функций, индуцированном агентом, когда она «не успевает» сформировать достаточной силы иммунный ответ? Пока ответа, очевидно, нет. Второй вопрос касается механизмов хронизации инфекционного процесса, хронического течения заболевания. Полученные литературные данные свидетельствуют об интимнейшем вовлечении в инфекционный процесс центрального органа иммунной системы — тимуса, главная функция которого заключается в формировании в организме центральной иммунной толерантности к собственным антигенам, которая осуществляется с помощью процессов позитивной и негативной селекции Т-клеток. Оказалось, что при ряде изученных инфекций под влиянием инфекционного агента, проникшего в тимус, происходят нарушения этих интимных процессов, которые реализуются формированием частичной толерантности к возбудителю и аутоиммунной реактивности. И эти процессы еще усугубляются гомеостатической пролиферацией, в индукции которой также принимает участие инфекционный агент. В обоих случаях это обуславливает снижение выраженности иммунного ответа к данному возбудителю, отягощенного появлением аутоиммунных реакций.

Ключевые слова: инфекция, микроорганизм, позитивная селекция Т-клеток в тимусе, негативная селекция Т-клеток в тимусе, гомеостатическая пролиферация, толерантность, аутоиммунитет.

Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.
Тел.: 8 (383) 222-66-27. Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Contacts:

Vladimir A. Kozlov
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrincevskaya str., 14,
Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology.
Phone: +7 (383) 222-66-27. Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Библиографическое описание:

Козлов В.А. Селекция клеток в тимусе и гомеостатическая пролиферация клеток на периферии при инфекционных процессах // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 629–638. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-629-638

Citation:

Kozlov V.A. T cell thymic selection and peripheral homeostatic proliferation in infectious diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 629–638. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-629-638

T CELL THYMIC SELECTION AND PERIPHERAL HOMEOSTATIC PROLIFERATION IN INFECTIOUS DISEASES

Kozlov V.A.^{a,b}

^a Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. There is no doubt that infectious agents and host undergo multilayered yet not fully understood interactions. This is primarily due to at least mechanisms resulting in chronic course of infectious process. Acute infection proceeds in parallel with primary immune response and its typical phases, each of which manifests as certain stage in clinical picture featured with disease onset and subsequent recovery. A whole process of immune response developing against infectious agent occurs in peripheral lymphoid organs and immune tissues. With regard to the role of immune system in infectious process, two main outstanding issues still remain unanswered: 1) what are the mechanisms of host death in the case of acute infectious process? 2) what is a “fault” of immune system in it? In its inferiority or in abruptly suppressed functions induced by infectious agent, when it “does not have time” to mount an immune response of sufficient power? So far, no answer is still found yet. The second question concerns mechanisms of converting to chronic course of infectious process. The obtained available in publications evidence about an intimately involved thymus as the central immune organ in infectious process of, the main function of which is to ensure developing central immune tolerance to self-antigens accomplished via T-cell positive and negative selection. It turned out that in case of some examined infections due to pathogens, which entered the thymus, such intimate events such as partial tolerance to pathogens and autoimmune reactivity are altered. Moreover, these processes are further aggravated by homeostatic proliferation, which is also induced by an infectious agent. In both cases, it accounts for decreased magnitude of immune response against a certain pathogen, burdened by emergence of autoimmune reactions.

Key words: infection, microorganism, T cell thymic positive and negative selection, homeostatic proliferation, tolerance, autoimmunity.

С точки зрения классической иммунологии острый инфекционный процесс это простой, классический первичный иммунный ответ на «инфекционный» антиген со всеми его, опять же классическими, фазами развития: индуктивной, фазой экспоненциального роста, фазой плато с переходом в фазу регрессии, снижения величины ответа практически до нуля с одновременным формированием популяции клеток памяти. Нами была выделена еще одна фаза перед индуктивной, обозначенная как директивная фаза. Необходимость такого выделения была продиктована полученными данными о том, что в первые часы после встречи с антигеном в иммунной системе происходят те морфофункциональные события, которые директивно и будут определять величину будущего иммунного ответа.

В случае повторной встречи макроорганизма с этим же антигеном иммунная система формирует классический вторичный иммунный ответ со всеми его фазами развития и характеристиками. Примером такого вторичного иммунного ответа является специфический ответ вакцинированного макроорганизма на инфекцию в случае повторной встречи с тем же вирусным или бактериальным антигеном.

Это если случай классический. К сожалению, довольно часто острая инфекция заканчивается переходом в хроническое течение. Почему? В принципе, на этот вопрос ответ может быть только один — виновата иммунная система, которая не смогла эффективно справиться

с «наплывом» антигенного материала и выжившие микроорганизмы (вирусы, бактерии и др.) формируют патологическое состояние в макроорганизме, специфическое для данного, конкретного возбудителя. Тогда возникает следующий вопрос: каковы механизмы снижения функциональной активности иммунной системы до иммунодефицитного состояния, которое и обуславливает хронизацию инфекционного процесса?

Учитывая морфофункциональное разделение иммунной системы в организме на центральные (тимус и костный мозг) и периферические (селезенка, лимфатические узлы, Пейеровы бляшки и др.) органы, следует разделить и механизмы формирования иммунодефицитного состояния на центральные и периферические. Что касается последних, то они достаточно подробно изучены и описаны. Это подразумевает участие в иммуносупрессивных механизмах различного рода регуляторных клеток с функцией подавления активности иммунокомпетентных клеток эффекторов. Таких клеток описано уже более 20 видов. В первую очередь это касается регуляторных клеток Treg, Tr1, Th3. Активно задействованы в супрессорных механизмах при различных патологиях клетки-супрессоры миелоидного происхождения, Vreg, макрофаги, дендритные клетки (ДК), стволовые мезенхимальные клетки, эритробласты. Имеющиеся данные о ведущей роли в патогенезе самых различных заболеваний (рак, атеросклероз, аутоиммунные

и аллергические заболевания, хронические инфекции) нарушений нормального функционирования иммунной системы позволяют говорить о, возможно, главном вкладе в эти механизмы изменений в согласованном действии гомеостатической системы иммуносупрессорных клеток. Описана их повышенная активность при опухолевых процессах и хронических инфекциях, но активность их снижена при атеросклерозе, аутоиммунных и аллергических заболеваниях [1, 3, 4, 5]. Важно подчеркнуть, что при многих хронических инфекциях определяется численное увеличение и повышение супрессорной активности тех же Treg, что, несомненно, является важнейшим фактором формирования хронизации процесса [2]. Возвращаясь к началу статьи, можно сказать, что клетки-супрессоры подавляют первичный или вторичный иммунный ответы, скорее всего, действуя в процессе индуктивной их фазы.

Сказанное выше относится к периферии иммунной системы, где протекает иммунный ответ к антигену от начала и до конца: от индукции ответа до появления иммунокомпетентных клеток-эффекторов. Но вопрос-то, касающийся функции тех же Treg при инфекционном процессе остается открытым. С одной стороны, активность Treg при инфекции необходима для подавления воспалительного процесса, который является патогенетическим сопровождением любой инфекции. Это позитивная роль Treg в данных условиях. Но вот если супрессорная активность регуляторных клеток выходит за рамки необходимого уровня, то начинает проявляться ингибирующее действие Treg на активность иммунокомпетентных клеток-эффекторов, отвечающих за полноценный иммунный ответ к инфекционному агенту [13, 31, 38].

Тогда и переходит острая фаза инфекционного процесса в хроническую со всеми вытекающими отсюда патогенетическими и терапевтическими последствиями. Описаны две основные субпопуляции клеток Treg. Одна из них возникает в тимусе (Foxp3⁺ Treg тимусного происхождения, или tTreg) из клеток, проходящих негативный отбор с высоким родством TCR к аутоантигенам и часть из них подвергается делеции, а часть дифференцируется в Treg. Механизмы этих выборочных, судьбоносных для клеток процессов пока еще не достаточно изучены. Вторая субпопуляция индуцируется (Foxp3⁺ Treg периферийного происхождения, или pTreg) на «иммунной» периферии из наивных CD4⁺Foxp3⁻ клеток с помощью различных механизмов [30].

Следовательно, что касается «иммунной» периферии, где формируется иммунный от-

вет к инфекционному началу, то выхода из начала инфекции может быть три: оптимальный иммунный ответ — выздоровление; субоптимальный — хронизация заболевания; слабый или отсутствие иммунного реагирования — гибель организма. В последнем случае к гибели организма может приводить (или приводит) гиперфункция клеток-супрессоров, обуславливающая полное подавление активности иммунокомпетентных клеток-эффекторов, отвечающих за формирование иммунитета. Вполне вероятно, что за состояние гиперсупрессии в организме при инфекциях могут отвечать сами возбудители: вирусы, бактерии и др. Имеются данные, что многие бактерии либо продуцируют вещества с иммуносупрессорной активностью, либо содержат субстанции в своей белковой оболочке, которые и могут формировать иммуносупрессивную обстановку в организме еще во время директивной фазы иммунного ответа за счет индукции активности клеток-супрессоров [6, 21, 35].

Процессы селекции Т-клеток в тимусе как основа формирования толерантности к аутоантигенам

Но только ли периферия отвечает за слабый иммунный ответ к той или иной инфекции? Все больше накапливается данных, что тимус, как центральный орган иммунной системы, по-видимому, вносит существенный вклад в процесс хронизации инфекционного заболевания. В настоящее время известно, что процессы дифференцировки Т-клеток в тимусе подразделяются на две стадии, связанные с позитивной селекцией тимоцитов, когда отбираются и остаются живыми только CD4⁻CD8⁻ клетки с TCR, распознающими аутоантигены, презентированными кортикальными эпителиальными клетками тимуса. Остальные клетки подвергаются делеции и погибают. В корковом веществе тимуса CD4⁺CD8⁻ клетки дифференцируются в CD4⁺CD8⁺, а затем в мозговом веществе последние дифференцируются в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, мигрирующие на периферию. Но перед этим в тимусе они проходят стадию негативной селекции, когда отбираются клетки, экспрессирующие TCR с незначительной аффинностью к аутоантигенам, а клетки с высокой степенью аффинности либо гибнут, либо дифференцируются в Treg [37]. В принципе, в мозговом веществе тимуса формируются основные механизмы центральной иммунной толерантности, когда гибнут клетки с потенциальной аутоагрессивностью и одновременно возникают регуляторные клетки с функцией подавления активности этих аутоагрессивных,

эффекторных лимфоцитов с потенциальной способностью к индукции аутоиммунной патологии.

Для предотвращения возможности индуцировать аутоиммунные реакции два гена — *Aire* и *Fezf2*, экспрессированные в эпителиальных клетках тимуса, отвечают одновременно и за гибель клеток с высокой аффинностью TCR к аутоантигенам, и за отбор Т-клеток со слабой аффинностью их рецепторов к аутоантигенам. Именно эти клетки и мигрируют из тимуса на периферию и отбирают эпитопы аутоантигенов для презентации Т-клеткам в тимусе [37]. Но что интересно: тот же *Aire* ген принимает участие в процессах дифференцировки в тимусе Treg из наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [30]. Не является ли это страховочным процессом возможной миграции на периферию клеток с высокоаффинным Т-клеточным рецептором?

По всей вероятности, в норме мигрируют из тимуса только клетки однопозитивные, то есть CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. Дважды позитивные тимоциты в тимусе дифференцируются, и они не должны и не мигрируют на периферию. Это в норме. А при патологии? Хотя у новорожденных мышей определяются дважды позитивные Т-клетки на периферии, но авторы предполагают возможность вмешательства в этот процесс каких-либо событий, обуславливающих развитие впоследствии аутоиммунной патологии у таких животных [7].

Очевидно, что при различного рода инфекциях в тимусе происходят изменения, обуславливающие нарушения в процессах созревания и миграции тимоцитов, изменения в процессе формирования иммунной толерантности. Имеются данные об атрофии тимуса при инфекциях, обусловленных *Human immunodeficiency virus*, *Simian immunodeficiency virus*, *Influenza virus*, *Lymphocytic choriomeningitis virus*, *Human cytomegalovirus*, *Measles virus*, *Salmonella enterica*, *Toxoplasma gondii* и многих других. Показано, что размеры атрофии тимуса коррелируют с вирулентностью возбудителя [28]. Следует подчеркнуть, что инфекция влияет на тимус двумя путями: локальным и системным. Под локальным путем подразумевается прямое инфицирование тимуса микроорганизмами. Системный путь отражает результаты действия инфекции на организм вне тимуса совместно с глюкокортикоидами и другими провоспалительными молекулами, попавшими в кровь. Описано появление на периферии CD4⁺CD8⁺ Т-клеток при инфекциях, вызванных *P. berghei*, HIV, вирусами гепатитов В и С (HBV и HCV) [26, 39]. Было обнаружено, что у мышей, инфицированных *Trypanosoma cruzi* (возбудитель болезни Шагаса у человека, известной под названием «американский трипаносомоз»), на периферии реги-

стрируется наличие незрелых, дважды позитивных CD4⁺CD8⁺ Т-клеток. Предполагается, что за этот феномен, на фоне атрофии тимуса и снижения продукции гормона тимулина, отвечают механизмы увеличения содержания фибронектина, ламинина и хемокинов CXCL12, CCL4 во внеклеточном матриксе тимуса с одновременным увеличением экспрессии на тимоцитах рецепторов к хемокинам CXCR4 и CCR5, к фибронектину и ламинину, таких как VLA-4, VLA-5, VLA-6, где особое значение имеет увеличение экспрессии VLA-4. Кооперация этих тимоцитов с измененным матриксом и является причиной повышенной миграции незрелых клеток из органа. Очевидно, стимулирующее влияние фибронектина на миграцию клеток усиливается цитокином TNF α , уровень которого в тимусе повышен при данной инфекции у мышей [29]. На один из механизмов повышенной миграции незрелых тимоцитов из тимуса претендует повышение продукции галектина-3 стромальными клетками и увеличение его экспрессии на тимоцитах. Известно, что галектины из семейства белков, связывающих β -галактозиды, модулируют такие процессы, как адгезия клеток, миграция, пролиферация и апоптоз. Показана четкая связь между увеличением содержания галектина-3 в корковом и мозговом веществе тимуса и миграцией из тимуса незрелых CD4⁺CD8⁺ Т-клеток на периферию [34]. По-видимому, инфекция в данном случае обуславливает также нарушение механизмов индукции толерантности к аутоантигенам. Об этом свидетельствует развитие аутоиммунного миокардита у животных [9, 22, 32], возможно, за счет «не презентации» соответствующих аутоантигенов в тимусе и миграции на периферию Т-клеток с аутоагрессией против антигенов сердца. Что касается CD4⁺CD8⁺ Т-клеток, мигрировавших из тимуса при данной инфекции (клетки-«мигранты»), то оказалось, что они на периферии приобретают характеристики эффекторных клеток, экспрессируют мРНК IFN γ , обладают цитотоксической активностью и, возможно, участвуют в развитии аутоиммунного миокардита [25].

Вполне вероятно, что феномен развития аутоиммунной патологии при данной инфекции связан с изменениями в характеристиках популяции Treg как в тимусе (tTreg), так и на периферии (pTreg). Отмечается снижение содержания обеих субпопуляций регуляторных клеток на фоне увеличенной доли tTreg в тимусе среди CD4⁺ Т-клеток [14]. Предполагается, что, по сравнению с наивными Т-клетками, tTreg менее чувствительны к изменению условий в тимусе, обуславливающих увеличение миграции тимоцитов на периферию при данной инфекции. Интересно, что атрофия тимуса,

появление на периферии незрелых CD4⁺CD8⁺ Т-клеток-«мигрантов» из тимуса, снижение активности супрессорного звена Т-клеток протекает на фоне подавления выхода из костного мозга предшественников Т-клеток [33]. Следует предположить, что эти данные могут свидетельствовать о дополнительном механизме нарушений функциональной активности тимуса, индуцированном инфекцией. Помимо негативного участия Treg в индукции аутоиммунного процесса при данной инфекции, именно снижение активности клеток-супрессоров лежит в основе хронизации инфекции в силу нехватки супрессоров для подавления воспалительного процесса.

По-видимому, два основных вывода следуют из представленных данных. Инфекционные агенты влияют на функцию тимуса, стимулируя миграцию на периферию незрелых тимоцитов и ингибируя миграцию в тимус предшественников Т-клеток из костного мозга на фоне изменения формирования популяции Treg в тимусе. При этом в тимусе нарушаются механизмы формирования центральной толерантности и на периферию мигрируют Т-клетки с определенной, повышенной степенью аутоагрессивности, не прошедшие процесс негативной селекции. Последние становятся потенциальной основой индукции аутоиммунной патологии при различных инфекциях. При этом страдает так же процесс дифференцировки Treg в тимусе. Кроме этого механизма, инфекция может индуцировать развитие аутоиммунных реакций и другим путем: за счет наличия молекулярной мимикрии между эпитопами возбудителя и тканевых антигенов, а первый стимулирует не только специфические Т-клетки, но и клетки-«мигранты» из тимуса с низким уровнем аффинности Т-клеточного рецептора, которые в норме не реагируют на аутоантигены, но начинают реагировать после стимуляции патогеном [11].

Процессы формирования центральной, «инфекционной» толерантности в тимусе, индуцированные внедрившимся патогеном

Помимо механизмов подавления иммунного ответа к инфекционным агентам на периферии иммунной системы с помощью популяции супрессорных Treg, накапливаются данные об участии тимуса в этих механизмах. Обнаружено, что многие вирусы, бактерии, грибки, паразиты проникают в тимус и вызывают изменения функциональной активности тимуса. Важнейшим фактором является то, что в тимусе формируются механизмы централь-

ной, патоген-специфической Т-клеточной толерантности, также приводящие к снижению иммунного ответа.

Было показано, что у мышей, инфицированных бактериями *Mycobacterium avium*, Т-клетки не способны формировать эффективный иммунный ответ к микроорганизмам на периферии, хотя при этом они сохраняли нормальный иммунный ответ к другим антигенам. В тимусе инфицированных животных микобактерии определялись в дендритных клетках мозгового вещества и кортико-медуллярной области, отвечающих за клональную делецию Т-клеток. Делается предположение, что в данных условиях формируется толерантность по центральному типу к антигенам микобактерий со значительным снижением на периферии специфической, эффекторной активности Т-клеток-«мигрантов» из тимуса [27]. Заражение мышей MLV в неонатальный период обуславливает инфицирование как тимоцитов, так и тимических стромальных клеток. При этом Т-клетки становятся толерантными к антигенам вируса [19]. Инфицирование *in utero* HBV индуцирует толерантность к вирусу [24], и такие дети становятся хроническими носителями вируса [36]. Скорее всего, толерантность в указанных случаях развивается в результате инфицирования стромальных клеток тимуса [19, 20].

Возможны два пути появления чужеродных антигенов в тимусе. Во-первых, вирусы и бактерии могут оказаться в тимусе, преодолев сосудистый барьер, где они будут фагоцитироваться местными ДК с последующей их презентацией. Во-вторых, Т-клетки с рецепторами для соответствующих эпитопов будут элиминироваться под действием механизмов негативной селекции.

По-видимому, более важным является второй путь доставки в тимус чужеродного антигенного материала. В основе его лежит способность, прежде всего, ДК с фагоцитированным антигеном мигрировать в тимус с последующей презентацией и индукцией негативной селекции. Скорее всего, основным поставщиком являются плазмацитоидные ДК (пДК), которые при внутривенном введении мышам, будучи нагруженными пептидным антигеном, индуцировали в тимусе делецию Т-клеток, экспрессирующих трансгенный Т-клеточный рецептор. За счет этого, как и в случаях с аутоантигенами формируется центральная толерантность к чужеродному антигену [8]. Следует отметить, что до 50% ДК в тимусе являются клетками вентимусного происхождения и попадают в тимус из циркуляции [10]. Показано, что «мигранты»-незрелые пДК являются индукторами функционально активных Treg на периферии. Можно видеть, что пДК двояким образом участвуют в процессе формирования иммунной толерант-

ности к чужеродным антигенам. На периферии они индуцируют супрессорные Treg, а в тимусе они отвечают за создание иммунной толерантности центрального происхождения к одному и тому же антигену. Это очень важно учитывать при возможном терапевтическом, антисупрессорном вмешательстве. Важнейшей характеристикой пДК, мигрирующих в тимус, является экспрессия молекул хемокинового рецептора CCR9 и интегрина $\alpha 4$. Данные молекулы отвечают как за миграцию клеток в тимус, так и за индукцию Treg на периферии. Показано, что стимуляция TLR на ДК продуктами микробного происхождения подавляет экспрессию указанных молекул и, следовательно, ингибирует их миграцию в тимус и снижает их способность индуцировать супрессорные клетки [15, 17]. В принципе, не очень понятна роль данного механизма в развитии инфекционного процесса. Инфекционный агент как бы одновременно индуцирует в макроорганизме механизмы, работающие против него. Очевидно, следует подумать об иной интерпретации данного механизма. Однако, если учесть подавление способности пДК индуцировать Treg в подобных ситуациях, тогда можно «оправдать» данный механизм инфекционного агента, направленный на снижение противовоспалительной активности регуляторных клеток в самом начале взаимодействия микро- и макроорганизма на периферии для успешного развития инфекционного процесса.

Помимо ДК, играющих роль возможных транспортеров антигенов микроорганизмов в тимус, эту функцию могут выполнять и Т-клетки, попадающие в тимус с периферии [16].

Полученные данные свидетельствуют о том, что число Treg-«мигрантов» из тимуса постепенно уменьшается на периферии с увеличением возраста. Это снижение Treg более выражено по сравнению с конвенциональными Т-клетками. Оказалось, что Treg с периферии реэмигрируют в тимус и у мышей, и у человека, где они оказывают негативное влияние на дифференцировку новых Treg в тимусе за счет снижения уровня ИЛ-2, который «реэмигранты» используют для поддержания своей жизнедеятельности в тимусе, который необходим для дифференцировки клеток-аборигенов тимуса. Кстати, в тимусе они находятся достаточно продолжительное время. С возрастом процесс реэмиграции возрастает параллельно со снижением образования новых Treg в тимусе [38]. Можно предположить, что снижение уровня Treg на периферии является одним из механизмов хронизации воспалительного сопровождения инфекционных заболеваний. При этом сам процесс уменьшения содержания Treg на периферии состоит из двух составляющих. С одной

стороны, регистрируется снижение миграции вновь образованных Treg из тимуса. С другой стороны, «реэмигранты» Treg тормозят образование новых регуляторных клеток в тимусе, усугубляя естественное снижение миграции, связанное с возрастными изменениями.

Инфекция как возможный индуктор аутоиммунной патологии

Выше уже говорилось о том, что нарушения процессов миграции из тимуса, индуцированные микроорганизмами *T. cruzi*, являются морфофункциональной основой формирования у мышей аутоиммунного миокардита [28], где атрофия тимуса является одним из важнейших признаков инфицирования тимуса патогеном. Следует напомнить, что атрофия тимуса сопровождает многие инфекции, такие как корь, бешенство, гепатит С, цитомегаловирус, ВИЧ [18] и, как правило, это сопровождается формированием иммунодепрессивного состояния. Не исключено, что при всех этих инфекциях активируются аутоиммунные реакции. По крайней мере, это можно четко видеть на примере участия вируса Коксаки В4 в патогенезе диабета I типа. Показано, что вирус проникает в клетки и вызывает повреждение и гибель α - и β -клеток островков поджелудочной железы. Из погибших клеток высвобождаются аутоантигены, на которые реагируют Т-клетки эффекторы на периферии, так как они (аутоантигены) были слабо представлены в тимусе (например, Igf2 — инсулин-родственный пептид) и соответствующие клетки не были деплецированы в тимусе, к ним формировалась только слабовыраженная толерантность. К тому же, в результате проникновения вируса в тимус развивалась толерантность уже к самому вирусу на фоне снижения активности Treg, уменьшения содержания в тимусе $CD4^+CD8^+$, возможно с усилением их миграции на периферию. Индукция толерантности к вирусу, в свою очередь, обуславливает уменьшение выраженности иммунного ответа к вирусу на периферии с повышением цитопатической активности вируса в отношении клеток поджелудочной железы [23]. Круг замкнулся: вирус вызывает гибель клеток поджелудочной железы; начинается формирование аутоиммунного ответа на эти аутоантигены; вирус, попадая в тимус, индуцирует состояние толерантности к нему; снижается иммунный ответ к вирусу; усиливается гибель клеток поджелудочной железы; возрастает интенсивность аутоиммунной реакции на аутоантигены. Клетки-мишени поджелудочной железы попадают под двойной «обстрел»: на них действуют и вирус, и аутоагрессивные Т-лимфоциты. Следует подумать

о том, как терапевтическим образом разорвать порочный круг, индуцированный в данном случае вирусом Коксаки В4, чтобы избавиться от этого достаточно грозного заболевания с помощью комплексного воздействия на иммунную систему.

Гомеостатическая пролиферация и инфекция

Не секрет, что многие и многие вирусные и бактериальные инфекции вызывают лимфопению. Причем лимфопению двоякую: как на периферии (тотальная лимфопения), и, если так можно выразиться, в тимусе (тимусная лимфопения). Смысл разделения на эти два вида состоит в том, что механизмы клеточной реконституции будут, по-видимому, различаться между собой. Восстановление клеточности в тимусе, очевидно, пойдет тремя путями: за счет клеток — предшественников тимоцитов, сохранившихся в тимусе после индукции атрофии; за счет усиленной миграции в тимус клеток-предшественников из костного мозга; и, наконец, нельзя исключить возможность реэмиграции в тимус наивных Т-клеток и клеток памяти из периферии. В то же время на периферии восстановление клеточности Т-лимфоцитов, по-видимому, в большей степени будет связано с интенсивностью процесса гомеостатической пролиферации среди Т-лимфоцитов в периферических лимфоидных органах; в зависимости от выраженности атрофии в той или иной степени восстановление будет связано с миграцией клеток из тимуса; и уж совсем исключается восстановление Т-лимфоцитов на периферии за счет предшественников — «мигрантов» из костного мозга, для которых необходимо тимусное микроокружение для возможности дифференцироваться в Т-клетки.

Так что же это такое — процесс восстановления численности Т-клеток при тотальной лимфопении, обозначенный как гомеостатическая пролиферация (ГомПро)? Считается, что ГомПро (homeostatic proliferation) или гомеостатическая периферическая экспансия (homeostatic peripheral expansion) обозначает процесс драматического митотического увеличения зрелых Т-клеток в условиях лимфопении, который у лиц с лимфопенией приводит к значительному росту численности клеток и обуславливает конверсию наивных Т-клеток в Т-клетки памяти. Процесс ГомПро отличается от процесса гомеостатической цикличности (homeostatic cycling) — обновления (реорганизации) наивных Т-клеток или Т-клеток памяти. Данный процесс протекает на периферии при полной насыщенности лимфоидных органов

лимфоцитами. При этом общее количество клеток не увеличивается, и не изменяются фенотипические соотношения наивных и Т-клеток памяти ни в органах, ни в циркуляции [1]. Среди процессов, которые могут вызывать лимфопению с последующей индукцией ГомПро, можно выделить следующие: неонатальная тимэктомия; адаптивный перенос лимфоцитов мышам и человеку, или сублетально облученным, или обработанным цитостатиками; вирусные и бактериальные инфекции; облучение и химиотерапия; токсические воздействия; хронический прием алкоголя; стрессовые факторы; финальная стадия иммунного ответа, когда в течение короткого периода времени гибнет через апоптоз значительное количество эффекторных Т-клеток [2].

Следует понимать, процесс ГомПро и обозначен как гомеостатический, ибо он отвечает за поддержку пула периферических Т-клеток на постоянном уровне, который устанавливается в молодом возрасте, несмотря на временно возникшую лимфопению под действием факторов внутреннего и внешнего происхождения. Важным моментом является и тот факт, что ГомПро является поликлональным процессом и протекает в отсутствие антигенного воздействия извне, в окружение клеточных элементов, презентующих пептиды эндогенного происхождения [2].

Учитывая последние данные необходимо подчеркнуть, что любая инфекция (вирусная или бактериальная), которая сопровождает жизнь каждого человека в течение онтогенеза и которая обуславливает появление лимфопении, будет заканчиваться процессом гомеостатической пролиферации с той или иной интенсивностью. Более того, по-видимому, любая вакцинация, индуцирующая полноразмерный иммунный ответ, также будет реализовываться через процесс ГомПро.

Сама по себе лимфопения, индуцированная инфекцией, является условием повышения пролиферации аутоагрессивных Т-клеток, активность которых, например, реализуется при переносе лимфопеническим мышам-реципиентам, но не нормальным животным. Интересным и, по-видимому, весьма важным, является тот факт, что экспансия тех же CD4⁺ Т-клеток в условиях лимфопении инициируется пептидами, аналогичными тем, которые индуцируют их позитивную селекцию в тимусе, в результате чего на периферии, в условиях лимфопении, пролиферируют только те Т-клетки, которые узнают собственные антигенные молекулы [12]. С одной стороны, в процессе позитивной селекции в тимусе аутопептиды обуславливают гибель клеток, которые их не узнают. С другой стороны, на периферии

эти же пептиды стимулируют пролиферацию Т-клеток. Можно с осторожностью утверждать, что активнее будут пролиферировать те Т-клетки, аффинность рецепторов у которых относительно выше, чем у других, и именно они и будут более вероятными кандидатами на роль индукторов аутоиммунной патологии. И в первую очередь это будет касаться инфекций. Выше уже говорилось о ряде нарушений в самом тимусе, в процессах миграции Т-клеток из тимуса, индуцированных вирусными и бактериальными инфекциями. Несомненно, что эти нарушения будут вносить весомый вклад в аутоиммунное сопровождение инфекционно-го процесса.

По всей вероятности можно предположить следующее. Учитывая данные о вмешательстве инфекционных агентов в процесс негативной селекции в тимусе, в результате которой формируется состояние, очевидно, частичной толерантности к антигенам возбудителя при участии генов «аутоиммунных регуляторов» *Aire* и *Fezf2*, следует думать и том, что и на периферии, где эти гены также функционируют, инфекционные агенты могут также вмешиваться в процесс селекции, усугубляя выраженность толерантности, индуцированную в тимусе. Если это так, то, несомненно, это вносит лепту в хронизацию инфекционного процесса, в формирование вторичного иммунодефицитного состояния.

По-видимому, одним из главных выводов влияния любой инфекции на процесс, происходящий в тимусе и на периферии среди Т-лимфоцитов, будет следующий: «тимусная

лимфопения» будет способствовать формированию неполной, частичной толерантности к возбудителям, возможно не ко всем, а только к проникающим в тимус, что будет заканчиваться снижением интенсивности специфического иммунного ответа к возбудителю и формированием хронизации процесса, вторичного иммунодефицитного состояния. Кроме того, вызванные инфекционным патогеном нарушения морфофункциональных характеристик тимуса будут способствовать индукции системной аутоиммунной патологии. В свою очередь, «тотальная лимфопения» на периферии, в конце концов, будет заканчиваться увеличением олигоклональности в популяции наивных Т-лимфоцитов, на базе чего постепенно формируется иммунодефицитное состояние в отношении тех же опухолевых антигенов, а в самом процессе гомеостатической пролиферации будут все больше и больше накапливаться клетки с агрессивной направленностью против собственных антигенов, что также будет способствовать возникновению аутоиммунной патологии.

В конце концов, почему бы не предположить, что в основе аутоиммунных и онкологических заболеваний лежат инфекции, в течение жизни не раз поражавшие пациентов, которые индуцировали комплексные изменения в тимусе, но реализация этих изменений в индукцию той или иной патологии начинается у разных пациентов в различное время, в зависимости от влияния внешних условий?

Если это так, то роль инфекций в жизни человека значительно усложняется и возрастает.

Список литературы/References

1. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация как основа неизбежного формирования тотального иммунодефицита // Медицинская иммунология. 2014. Т. 16, № 5. С. 403–408. [Kozlov V.A. Homeostatic proliferation as a basis for the inevitable formation of total immunodeficiency. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russian)*, 2014, vol. 16, no. 5, pp. 403–408. doi: 10.15789/1563-0625-2014-5-403-408 (In Russ.)]
2. Козлов В.А. Директивная фаза иммунного ответа в проблеме регуляции // Методологические аспекты современной иммунологии. Новосибирск: Наука, 1991. С. 45–51. [Kozlov V.A. Directive phase of the immune response in the problem of regulation. *Novosibirsk: Nauka*, 1991, pp. 45–51. (In Russ.)]
3. Козлов В.А. Клетки-супрессоры — основа иммунопатогенеза атеросклероза // Атеросклероз. 2015. Т. 11, № 2. С. 37–42. [Kozlov V.A. The suppressor cells — the basis of immunopathogenesis of atherosclerosis. *Ateroskleroz = Atherosclerosis*, 2015, vol. 11, no. 2, pp. 37–42. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-7-14 (In Russ.)]
4. Козлов В.А. Клетки-супрессоры — основа иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 7–15. Kozlov V.A. Suppressor cells — the basis of immunopathogenesis autoimmune diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 7–15. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-7-14 (In Russ.)]
5. Козлов В.А. Клетки-супрессоры — основа иммунопатогенеза онкозаболеваний // Вопросы онкологии. 2016. № 3. С. 390–396. [Kozlov V.A. Suppressor cells — the basis of the immunopathogenesis of cancer. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2016, vol. 62, no. 3, pp. 390–396. (In Russ.)]
6. Козлов В.А., Демина Д.В. Регуляторные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе аллергических заболеваний // Иммунология. 2017. Т. 38, № 6. С. 327–336. [Kozlov V.A., Demina D.V. Participation of regulatory suppressor cells in the immunopathogenesis of allergic diseases. *Immunologiya*, 2016, vol. 38, iss. 6, pp. 327–336. doi: 10.18821/0206-4952-2017-38-6-327-336 (In Russ.)]
7. Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K., Kim S., Fritz J.V., Wilmes P., Ueha S., Matsushima K., Ohno H., Olle B., Sakaguchi S., Taniguchi T., Morita H., Hattori M., Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 2013, vol. 500, no. 7461, pp. 232–236. doi: 10.1038/nature12331

8. Bomoto A., Kehn P.J., Shevach E.M. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, pp. 1509–1518.
9. Bonasio R., Scimone M.L., Schaerli P., Grabie N., Lichtman A.H., von Andrian U.H. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.*, 2006, vol. 7, pp. 1092–1100. doi: 10.1038/ni1385
10. Cotta-de-Almeida V., Bonomo A., Mendes-da-Cruz D.A., Riederer I., de Meis J., Lima-Quaresma K.R.F., Vieira-de-Abreu A., Villa-Verde D.M.S., Savino W. Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of Extracellular matrix ligand and receptors and alters thymocyte Migration. *Eur. J. Immunol.*, 2003, vol. 33, pp. 2439–2448. doi: 10.1002/eji.200323860
11. Donskoy E., Goldschneider I. Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 7, pp. 3514–3521. doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3514
12. Enouz S., Carrie L., Merkler D., Bevan M.J., Zehn D. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J. Exp. Med.*, 2012, vol. 209, no. 10, pp. 1769–1779. doi: 10.1084/jem.20120905
13. Ernst B., Lee D.S., Chang J.M., Sprent J., Surh C.D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity*, 1999, vol. 11, no. 2, pp. 173–181.
14. Fulton R.B., Meyerholz D.K., Varga S.M. Foxp3⁺ CD4 Regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.*, 2010, vol. 185, no. 4, pp. 2382–2392. doi: 10.4049/jimmunol.1000423
15. Gonzalez F.B., Calmon-Hamaty F., Cordeiro S.N.S., Bussy R.F., Spinelli S.V., D’Attilio L., Bottasso O., Savino W., Cotta-de-Almeida V., Villar S.R., Perez A.R. Trypanosoma cruzi experimental infection impacts on the thymic Regulatory N cell compartment. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 10, no. 1, pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pntd.0004285
16. Hadeiba H., Butcher E.C. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 2013, vol. 43, no. 6, pp. 1425–1429. doi: 10.1002/eji.201243192
17. Hadeida H., Lahl K., Edalati A., Oderup C., Habtezion A., Pachynski R., Nguyen L., Ghodsi A., Adler S., Butcher E.C. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the Thymus to promote central tolerance. *Immunol.*, 2012, vol. 36, no. 3, pp. 438–450. doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.017
18. Hale J.S., Fink P.J. Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol. Cell. Biol.*, 2009, vol. 87, no. 1, pp. 58–64. doi: 10.1038/icb.2008.87
19. Jaidane H., Sané F., Hiar R., Goffard A., Gharbi J., Geenen V., Hober D. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, vol. 168, no. 1, pp. 39–46. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04558.x.
20. Korostoff J.M., Nakada M.T., Faas S.J., Blank K.J., Gaulton G.N. Neonatal exposure to thymotropic gross murine leukemia virus Induces virus-specific immunological nonresponsiveness. *J. Exp. Med.*, 1990, vol. 172, no. 6, pp. 1765–1775.
21. Lamontagne L., Jolicoeur P. Low-virulent mouse viruses exhibiting various tropisms in macrophages, T and B cell subpopulations, and thymus stromal cells. *Lab. Anim. Sci.*, 1994, vol. 44, no. 1, pp. 17–24.
22. Leake I. Gut microbiota: selecting Clostridia strains that induce TREG cells from gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, vol. 10, no. 9, p. 504. doi: 10.1038/nrgastro.2013.139
23. Mendes-da-Cruz D.A., Silva J.S., Cotta-de-Almeida V., Savino W. Altered thymocyte migration during experimental acute Trypanosoma cruzi infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur. J. Immunol.*, 2006, vol. 36, no. 6, pp. 1486–1493. doi: 10.1002/eji.200535629
24. Michaux H., Martens H., Jaidane H., Halouani A., Hober D., Geenen V. How does thymus infection by coxsackievirus contribute to the pathogenesis of type 1 diabetes? *Frontiers in Immunol.*, 2015, vol. 6, pp. 338–343. doi: 10.3389/fimmu.2015.00338
25. Milich D.R., Jones J.E., Hughes J.L., Price J., Raney A.K., McLachlan A. Is function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, no. 17, pp. 6599–6603.
26. Morrot A., Terra-Granado E., Perez A.R., Silva-Barbosa S.D., Milicevic N.M., Farias-de-Oliveira D.A., Berbert L.R., De Meis J., Takiya C.M., Beloscar J., Wang X., Kont V., Peterson P., Bottasso O., Savino W. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4⁺CD8⁺ T cells in severe forms of human disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, vol. 5, no. 8: e1268. doi: 10.1371/journal.pntd.0001268
27. Nascimbeni M., Pol S., Saunier B. Distinct CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5: e20145. doi: 10.1371/journal.pone.0020145
28. Nobrega C., Roque S., Nunes-Alves C., Coelho A., Medeiros I., Castro A.G., Appelberg R., Correia-Neves M. Dissemination of Mycobacteria to the thymus renders newly generated T cells tolerant to the invading pathogen. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, pp. 351–358. doi: 10.4049/jimmunol.0902152
29. Nunes-Alves C., Nobrega C., Behar S.M., Correia-Neves M. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunol.*, 2013, vol. 34, no. 10, pp. 502–510. doi: 10.1016/j.it.2013.06.004
30. Perez A.R., Berbert L.R., Lepletier A., Revelli S., Bottasso O., Silva-Barbosa S.D., Savino W. TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental trypanosoma cruzi infection and favor the export of immature cells. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 3: e34360. doi: 10.1371/journal.pone.0034360
31. Richards D.M., Delacher M., Goldfarb Y., Kagebein D., Hofer A.-C., Abramson J., Feuerer M. Treg cell differentiation: from thymus to peripheral tissue. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2015, vol. 136, pp. 175–205. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.07.014
32. Rogers M.C., Lamens K.D., Shafagati N., Johnson M., Oury T.D., Joyce S., Williams J.V. CD4⁺ regulatory T cells exert differential functions during early and late stages of the immune response to respiratory viruses. *J. Immunol.*, 2018, vol. 201, no. 4, pp. 1253–1266. doi: 10.4049/jimmunol.1800096
33. Savino W., Leite-de-Moraes M.C., Hontebeyrie-Joskowicz M., Dardenne M. Studies on thymus in Chagas’ disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. *Eur. J. Immunol.*, 1989, vol. 19, no. 9, pp. 1727–1733. doi: 10.1002/eji.1830190930

34. Savino W., Villa-Verde D.M., Mendes-da-Cruz D.A., Silva-Monteiro E., Perez A.R., Aoki Mdel P., Bottasso O., Guiñazú N., Silva-Barbosa S.D., Gea S. Cytokines and cell adhesion receptor in the regulation of immunity to Trypanosoma cruzi. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007, vol. 18, no. 1–2, pp. 107–124. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.010
35. Silva-Monteiro E., Lorenzato L.R., Nihei O.K., Junqueira M., Rabinovich G.A., Hsu D.K., Liu F.-T., Savino W., Chammas R., Villa-Verde D.M.S. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during Trypanosoma cruzi infection. *Am. J. Pathol.*, 2007, vol. 170, no. 2, pp. 546–556. doi: 10.2353/ajpath.2007.060389
36. Stephen-Victor E., Karnam A., Fontaine T., Beauvais A., Das M., Hegde P., Prakhar P., Holla S., Balaji K.N., Kaveri S.V., Latgé J.P., Aimaganianda V., Bayry J. Aspergillus fumigatus cell wall α -(1,3)-glucan stimulates regulatory T-cell polarization by inducing PD-L1 expression on human dendritic cells. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216, no. 10, pp. 1281–1294. doi: 10.1093/infdis/jix469
37. Stevens C.E., Beasley R.P., Tsui J., Lee W.C. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N. Engl. J. Med.*, 1975, vol. 292, no. 15, pp. 771–774. doi: 10.1056/NEJM197504102921503
38. Takada H., Takayanag H. The mechanisms of T cell selection in the thymus. *Trends Immunol.*, 2017, vol. 38, no. 11, pp. 805–816. doi: 10.1016/j.it.2017.07.010
39. Thiault N., Darrigues J., Adoue V., Gros M., Binet B., Perals C., Leobon B., Fazilleau N., Joffre O.P., Robey E.A., van Meerwijk J.P., Romagnoli P. Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.*, 2015, vol. 16, no. 6, pp. 628–634. doi: 10.1038/ni.3150
40. Wang J., Cardoso R., Marreros N., Müller N., Lundström-Stadelmann B., Siffert M., Vuitton D.A., Boué F., Lin R., Wen H., Gottstein B. Foxp3+ Tregs 1 as a potential target for immunotherapy against primary infection with Echinococcus multilocularis eggs. *Infect. Immun.*, 2018, vol. 86, iss. 10: e00542-18. doi: 10.1128/IAI.00542-18
41. Weiss L., Roux A., Garcia S., Demouchy C., Haeffner-Cavaillon N., Kazatchkine M.D., Gougeon M.L. Persistent expansion, in a Human immunodeficiency virus-infected person, of V β -restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *J. Infect. Dis.*, 1998, vol. 178, iss. 4, pp. 1158–1162. doi: 10.1086/515674

Автор:

Козлов В.А., академик РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия; зав. кафедрой клинической иммунологии ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Author:

Kozlov V.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Scientific Director, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation; Head of the Department Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.02.2019
Отправлена на доработку 04.03.2019
Принята к печати 17.09.2019

Received 04.02.2019
Revision received 04.03.2019
Accepted 17.09.2019

СОВРЕМЕННОЕ ПОНИМАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ТОКСИНОВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ПОДХОДЫ К БЛОКИРОВАНИЮ ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов

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

Резюме. В обзорной статье приводятся результаты разносторонних исследований механизмов ингибирования цитотоксического действия сибиреязвенного токсина на клетки иммунной системы. Рассмотрены различные формы заболевания, иммунопатогенез и современные методы лечения сибирской язвы. Описан сибиреязвенный токсин *Bacillus anthracis*. Детально описана структурно-функциональная организация протективного антигена, летального и отечного факторов. Представлен механизм ассоциации протективного антигена и летального фактора, приводящий к образованию летального токсина, а также описан процесс образования комплекса протективный антиген — отечный фактор, формирующего отечный токсин. Рассмотрено участие доменов протективного антигена в процессе взаимодействия с рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток и охарактеризованы особенности связывания протективного антигена с летальным фактором и отечным фактором. Описаны механизмы интернализации комплексов токсинов в эндосому и последующая транслокация эффекторных молекул в цитозоль. Проанализированы направленность действия летального и отечного факторов на структуры эукариотических клеток, механизмы цитотоксичности. На основании описанной последовательности проявления цитотоксической активности токсинами *B. anthracis* проанализированы подходы к блокированию их действия на различных стадиях токсикоемии. Описаны полученные к настоящему времени химерные и гуманизированные моноклональные антитела, способные нейтрализовать токсины *B. anthracis* на разных этапах сборки. В частности, рассмотрены препараты, ингибирующие: межрецепторные взаимодействия протективного антигена с рецепторами эукариотической клетки; фуриноподобные ферменты, активирующие сборку препоры; олигомеризацию протективного антигена; связывание летального или отечного факторов с протективным антигеном; транслокацию летального или отечного факторов сибирской язвы в цитозоль клетки; транскрипцию протективного антигена с летальным или отечным факторами из эндосом; ферментативную активность летального или отечного факторов. Рассмотрены препараты, утвержденные для профилактики и лечения сибирской язвы в России и за рубежом. Описаны имеющиеся недостатки используемых препаратов и направления по их совершенствованию. В состав перспективных направлений входят ингибирование ферментативной активности летального фактора, препятствие ассоциации компонентов токсинов, блокирование взаимодействия токсических комплексов с рецепторами клеток иммунной системы.

Ключевые слова: протективный антиген, летальный фактор, отечный фактор, токсин, иммунопатогенез.

Адрес для переписки:

Фирстова Виктория Валерьевна
142279, Россия, Московская область, п. Оболенск,
ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03. Факс: 8 (4967) 36-00-10.
E-mail: firstova@obolensk.org

Contacts:

Victoria V. Firstova
142279, Russian Federation, Moscow Region, Obolensk,
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-00-03. Fax: +7 (4967) 36-00-10.
E-mail: firstova@obolensk.org

Библиографическое описание:

Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы и подходы к блокированию их цитотоксического действия // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 639–647. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-639-647

Citation:

Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A. Current understanding of Bacillus anthracis toxin molecules organization and approaches for blocking their cytotoxic action // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 639–647. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-639-647

CURRENT UNDERSTANDING OF *BACILLUS ANTHRACIS* TOXIN MOLECULES ORGANIZATION AND APPROACHES FOR BLOCKING THEIR CYTOTOXIC ACTION

Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. Here, we review the data on mechanisms inhibiting cytotoxic effect of anthrax toxin on the immune system cells. Various disease forms, immunopathogenesis and contemporary methods for anthrax treatment are discussed. In addition, an anthrax toxin was outlined, whereas structural and functional organization of the protective antigen, lethal and edema factors was detailed. A mechanism for association of a protective antigen and lethal factor, protective antigen and edema factor leading to formation of a lethal toxin and edema toxin, respectively, was described. Participation of protective antigen domains in the process of interaction with surface receptors of immunocompetent cells as well as features of binding a protective antigen with lethal factor and edema factor are discussed. A mechanism of endosomal toxin complex internalization and subsequent transfer of effector molecules to the cytosol are described. Effects of the lethal factor and the edema factor on components of eukaryotic cells as well as cytotoxicity mechanisms are analyzed. The approaches to block anthrax toxin action at various stages of toxicoemia have been analyzed based on previously uncovered sequential signs of cytotoxic activity for *Bacillus anthracis* toxins. Currently available chimeric and humanized monoclonal antibodies are capable of neutralizing *B. anthracis* toxins at diverse assembly stages, particularly considering the drugs inhibiting: inter-receptor interaction between protective antigen with eukaryotic cells; furin-like enzymes activating prepore assembly; protective antigen oligomerization; binding of the lethal factor or edema factor to the protective antigen; translocation of the lethal factor or the edema factor into cell cytosol; transport of protective antigen with lethal factor or edema factor from endosomes; enzymatic activity of lethal factor or edematous factor. The anti-toxin agents approved for anthrax prevention and treatment in Russia and worldwide are discussed. The limitations of anti-toxin agents and perspectives for their improvement are also described including inhibition of lethal factor activity, interference with integration of toxin components, blockade of interactions between toxic complexes and immune cell receptors.

Key words: *B. anthracis*, protective antigen, lethal factor, edema factor, toxin, immunopathogenesis.

Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы

Сибирская язва — особо опасная инфекция, которая в зависимости от пути проникновения возбудителя развивается в кожной, аэрогенной или гастроэнтеральной формах. У людей наиболее распространенной формой заболевания сибирской язвой является кожная при которой появляются язвы и отечность в местах проникновения патогена. При кожной форме сибирской язвы даже в отсутствие лечения летальность составляет 10–20%, а при проведении антибиотикотерапии снижается до минимума. Кишечная форма, возникающая при проглатывании спор, вызывает более серьезное системное заболевание, приводящее к поражению желудочно-кишечного тракта, лимфадениту, отеку внутренних органов и, в конечном счете, к заражению крови. На поздних стадиях заболевания эта форма сибирской язвы не поддается лечению. И, наконец, самая опасная форма сибиреязвенной инфекции — легочная, которая, как и кишечная, имеет системный характер, но характеризуется крайне быстрым развитием и высоким процентом летальности (до 80% заболевших). Даже при своевременно начатой терапии на ранних этапах заболевания сибирской язвой при кишечной, легочной или менингеальной формах — прогноз неблагоприятный.

При проникновении в легкие большая часть спор фагоцитируется макрофагами и дендритными клетками. После поглощения спор фагоциты устремляются в ближайшие лимфатические узлы для презентации антигена лимфоцитам. Однако часть спор выживает и прорастает (вегетативная форма) в фагоцитах и, таким образом, дендритные клетки и макрофаги выполняют роль системы доставки возбудителей сибирской язвы в лимфатические узлы. Вегетативные бактерии *B. anthracis* лизируют оболочку фагоцитов, размножаются в лимфатической системе, а затем мигрируют в кровоток.

В течение первых недель после инфицирования организма симптомы заболевания могут отсутствовать, а затем появляется кашель и поднимается температура. Бактерии проникают в кровь и, когда количество бактерий достигает критического уровня, у больного затрудняется дыхание, развивается шоковое состояние и обширные кровоизлияния, зачастую сопровождающиеся припадками. Проявление таких симптомов обуславливают летальный и отечный токсины *B. anthracis*. После достижения критической стадии терапия антибиотиками становится неэффективной, и в течение 24 ч в преобладающем большинстве случаев больной погибает. Это связано с тем, что даже после уничтожения бактерий антибиотиками типа ципрофлоксацина и/или доксициклина [9, 20], летальный и отечный токсины продол-

жают циркулировать в крови и проявлять цитотоксичность. Поврежденные токсином макрофаги синтезируют в большом количестве провоспалительные цитокины, которые приводят к развитию шокового состояния и, как следствие, к смерти. Единственным решением для предотвращения летального исхода у больного на поздней стадии сибиреязвенной инфекции может быть специфическая терапия, направленная против токсинов. Для создания средств антитоксинной терапии необходимо сконструировать высокоэффективный ингибитор избранной мишени, а это возможно только при полном понимании механизмов проникновения токсинов и действия их в организме.

К главным факторам вирулентности *B. anthracis* относятся капсульный антиген и сибиреязвенный токсин, которые начинают синтезироваться сразу после прорастания споры. Сибиреязвенный токсин представляет собой трехкомпонентную систему, стоящую из протективного антигена (ПА), летального фактора (ЛФ) и отежного фактора (ОФ), кодирующимися генами плазмиды *pOX1*. ЛФ и ОФ являются ферментами, которые модифицируют внутриклеточные сигнальные пути, а ПА обеспечивает транслокацию ЛФ и ОФ в цитозоль клетки. Каждый из компонентов токсина отдельно нетоксичен. Эти компоненты относятся к широкому классу токсинов, именуемых АБ токсинами. Отежный и летальный факторы относятся к компоненту А, а протективный антиген — к компоненту Б. Бинарные комбинации этих секретируемых белков составляют два токсина сибирской язвы: ПА в комбинации с ЛФ образуют летальный токсин (ЛТ), а ПА в комбинации с ОФ — отежный токсин (ОТ). Протективный антиген присоединяется к рецепторам клетки хозяина и способствуют проникновению в ее цитозоль ОФ или ЛФ, формируя пору на поверхности клетки. ЛТ и ОТ препятствуют формированию клеточного ответа на бактериальную инфекцию, разрушают систему иммунитета клетки и, таким образом, способствуют распространению бактерий [3]. По мере развития болезни токсины накапливаются в кровотоке и на поздних этапах являются главной причиной патологии. Это подтверждено в экспериментах на мышинной модели: внутривенное введение ЛТ вызывает гибель экспериментальных животных. Гибель мышей от внутривенного введения ЛТ ассоциирована с шоком, разрушением сосудов и общей гипоксией. Действие ОТ приводит к повреждению тканей, дисфункции различных органов, кровоизлияниям и понижению давлению.

Протективный антиген (ПА) массой 83 kDa является центральным компонентом токсинов

сибирской язвы. ПА характеризуется ярко выраженными иммуногенными свойствами и поэтому ПА является основным компонентом при разработке вакцин.

Мономерный ПА представляет собой белок, состоящий из 735 аминокислотных остатков, разделенный на 4 структурных домена (рис. 1, вклейка). Основные функции 1-го домена ПА (с 1 по 258 аминокислотный остаток) заключаются в связывании ЛФ и ОФ, 2-го домена (с 259 по 487) — в связывании ПА₆₃ мономеров и формировании петли, которая встраивается в мембрану лейкоцита и формирует катион-селективный канал [36], 3-го домена (с 488 по 595) — в олигомеризации и/или связывании ЛФ и ОФ, 4-го домена (с 596 по 735) — в связывании с рецепторами на поверхности эукариотических клеток [27].

Протективный антиген связывается с рецепторами, которые встречаются на поверхности многих типов клеток организма человека. В частности, ПА способен связываться с рецептором TEM8 (tumor endothelium marker 8), CMG2 (capillary morphogenesis protein 2), β1-интегрином и с участием других белков проникать внутрь эукариотической клетки путем рецептор-зависимого эндоцитоза [28, 32, 21]. TEM8 еще называют рецептором сибирской язвы 1 (Anthrax Toxin Receptor — ATR1), CMG2 — рецептором сибирской язвы 2 (ATR2). Основные функции белков TEM8 и CMG2 заключаются в том, что они являются молекулами клеточной адгезии и вовлечены в ангиогенез [4, 16]. Экспрессия CMG2 наблюдается в большинстве человеческих тканей, а TEM8 экспрессируется главным образом на опухолевых эндотелиальных и раковых клетках [16, 22]. CMG2, TEM8 и β1-интегрин относятся к трансмембранным белкам типа 1, имеющим высококонсервативный внеклеточный домен фактора фон Виллебранда типа А, который связывается непосредственно с ПА. Рецепторы CMG2, TEM8 и β1-интегрин имеют структурные отличия в основном в своих цитоплазматических доменах, которые не влияют на связывание и транслокацию токсинов сибирской язвы [18].

После связывания с TEM8, β1-интегрином и/или CMG2 клеточным рецептором полноразмерный ПА₈₃ подвергается процессингу фуриноподобными протеазами клетки-хозяина с отщеплением 167 N-концевых аминокислотных остатков протективного антигена молекулярной массой около 20 kDa (ПА₂₀), располагающихся в домене 1. Оставшаяся часть первого домена обозначается 1' (аминокислотные остатки 168–258), а вся оставшаяся часть ПА массой 63 kDa — ПА₆₃. Домен 1' взаимодействует с двумя ионами Ca²⁺, содержит сайт расщепления фурина и предотвращает олигомеризацию полноразмерного ПА [44].

Активированный ПА₆₃ спонтанно образует гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами (рис. 2, вклейка). Анализ кристаллографической структуры гептамерной препоры показал, что она построена на основании мономер-мономерного контакта между поверхностями доменов 1' и 4 ПА₆₃. Наличие или отсутствие ПА20 практически не влияет на формирование препоры. Обязательным участником в формировании препоры является домен 3, который участвует в олигомеризации ПА, и домен 2, формирующий большую гибкую петлю, вовлеченную во взаимодействие с мембраной и в связывание с рецептором на поверхности эукариотической клетки [34].

Домены 1', 3, 4 формируют венчик, а домен 2 — чашевидную структуру 2с (из аминокислотных остатков 259–274 и 354–487) и стель 2s (275–353) поры ПА (рис. 1). Домены 1' и 2с формируют компактную структуру протеина, ответственную за связывание с отечным и летальным факторами и обеспечивает их эндоцитоз. Диаметр образованной в мембране лейкоцита препоры составляет 20–30 Å вначале, сужаясь далее до 6 Å, что позволяет предположить прохождение ЛФ и ОФ внутрь клетки в нефолдированном состоянии [23].

После протеолитического отщепления части домена 1 ПА (рис. 2, синий цвет) оставшаяся часть (ПА₆₃) олигомеризуется и связывается с ЛФ (красный цвет). Образованный летальный токсинный комплекс связывается с рецептором клеточной поверхности (желтый) и захватывается клеткой путем эндоцитоза. В процессе созревания содержимое эндосомы закисляется, что способствует превращению препоры ПА в истинную пору. Летальный фактор в кислой среде разворачивается и транслоцируется через канал ПА.

Важно отметить, что сайт связывания на поверхности ПА для эффекторных субъединиц ЛФ и/или ОФ формируется только при олигомеризации ПА. В верхней части рисунка 2 показаны два возможных варианта стехиометрии летального токсина, что обусловлено разным соотношением мономеров ПА и ЛФ: PA7-LF3 и PA8-LF4. Каждые две ПА-субъединицы создают сайт привязки для одного ЛФ. В результате гептамер ПА содержит три ЛФ и имеет пустой полусайт, в котором контакты ЛФ-ЛФ прерываются. Октамер содержит четыре молекулы ЛФ, которые полностью образует контакты ЛФ-ЛФ вокруг кольца [24].

Процесс олигомеризации ПА ускоряется в присутствии ЛФ и/или ОФ, вероятно за счет стабилизирующего действия мультимерных комплексов ЛФ и ОФ. Быстрая агрегация ПА с ЛФ или ОФ обеспечивает эффективную транслокацию энзиматических субъединиц токсинов

внутри клетки и сводит к минимуму вероятность интернализации пустых гептамеров ПА [11]. Олигомерные комплексы ПА вызывают кластеризацию рецепторов на поверхности эукариотической клетки, усиливая эффективность связывания ПА с поверхностью клетки.

После связывания ПА с ЛФ или ОФ, образованный комплекс захватывается клеткой путем клатрин-зависимого эндоцитоза. Для интернализации токсинов сибирской язвы рецепторы CMG2, TEM8 и β1-интегрин должны связаться с рецептор-подобным белком LRP6 (LRP-receptor related protein), который является необходимым участником для эффективного эндоцитоза [28, 37, 43]. Образованный комплекс проникает внутрь клетки. Интернализация комплексов токсинов сибирской язвы стимулируется за счет кальпаин-зависимого разрушения талина, который связывает интегрины с активным цитоскелетом, что способствует эндоцитозу токсина (рис. 3, вклейка). Ингибирование кальпаина не снижает уровень адгезии ПА к рецепторам эукариотической клетки, но снижает эндоцитоз [8, 21].

После образования эндосомы начинается ее созревание в процессе которого происходит закисление среды. При снижении pH в структуре ПА происходят конформационные изменения в результате которых второй домен ПА внедряется в мембрану эндосомы, формируя истинную пору. Закисление pH среды эндосомы приводит также к конформационным изменениям ЛФ и ОФ, которые разворачиваются и транслоцируются через истинную пору, сформированную ПА, в цитозоль клетки [7]. Попав в цитозоль, ЛФ и ОФ катализируют реакции, нарушающие нормальное физиологическое состояние клетки.

Летальный фактор представляет собой высокоспецифичную Zn²⁺-зависимую металлопротеазу, которая расщепляет вблизи N-конца последовательности киназ семейства MAPKK (mitogen activated protein kinase kinases — митоген-активируемые протеинкиназные киназы). Анализ трехмерной структуры этой протеазы указывает на то, что, по-видимому, эволюционно ген ЛФ появился в результате процессов дупликаций, мутаций и слияния различных генов, что привело к появлению протеазы с крайне высокой специфичностью. Летальный фактор — крупный белок весом 94 kDa, который состоит из 4 доменов [31] (рис. 4, III обложка). Домен 1 ЛФ (аминокислотные остатки 1–263) связывает ПА, он необходим для проникновения ЛФ внутрь клетки. При связывании с ПА N-концевая α-спираль ЛФ отходит от основного корпуса и перемещается в область α-зажима ПА [30]. Домен 2 (аминокислотные остатки 264–299 и 386–550) вовлечен в узнавание C-терминальной части субстратного

пептида. Домен 3 (остатки 300–385), так называемый «спиральный пучок», встроен в домен 2, и вовлечен в узнавание субстрата P1-P5'. Домен 4 (остатки 551–776) является каталитическим центром связывания иона Zn^{2+} . Общая структура каталитического домена уникальна и не имеет гомологов.

Летальный фактор совместно с ПА образует ЛТ, который проявляет цитотоксичность по отношению к макрофагам. Действие ЛФ направлено на семейство сигнальных молекул МАРКК. В результате цепи последовательных фосфорилирований нескольких различных протеинкиназ активируется одна из МАР (митоген-активируемый протеин) протеинкиназ. Действие ЛФ направлено на МАРКК 5, семейство белков, участвующих в передаче сигналов, необходимых для нормального роста и дифференцировки клеток. Протеолиз N-конца МАРКК под влиянием ЛФ блокирует сигналы необходимые для активации и рекрутинга других иммунных клеток с целью уничтожения возбудителя инфекции. Гибель клеток макрофагального звена может происходить как через МКК (Protein Kinase Kinase)-зависимые, так и с МКК-независимые механизмы. Механизм цитотоксичности определяется особенностями клеточной культуры и наличием или отсутствием воспалительных стимулов.

Отечный фактор является кальмодулин-зависимой аденилатциклазой молекулярной массой 89 kDa. Уровень активности аденилатциклазы ОФ примерно в 1000 раз выше, чем уровень активности аденилатциклазы млекопитающих. Используя кальмодулин и АТФ эукариотических клеток, отечный фактор повышает в них концентрацию цАМФ. За счет увеличения концентрации цАМФ развивается отек в очаге инфекции и подавляется хемотаксис нейтрофилов. С увеличением уровня клеточного цАМФ нарушается водный баланс, что препятствует нормальному функционированию сигнальных каскадов в клетке. Отечный фактор состоит из N-концевого ПА-связывающего домена, центрального каталитического домена и C-концевого спирального домена (рис. 5, III обложка). По структуре и функциям N-концевой домен гомологичен 1 домену ЛФ. Каталитический домен структурно сходен с доменами других аденилатциклаз бактериальных токсинов (например, токсинов *Bordetella pertussis* СуаА, *Pseudomonas aeruginosa* ExoY). Спиральный домен ОФ располагается напротив каталитического домена в инактивированном состоянии. Кальмодулин, встраиваясь между спиральным и каталитическим доменами ОФ, раздвигает их, что приводит к повороту одного домена относительно другого примерно на 30 градусов. Такое взаимодействие между

кальмодулином и ферментом приводит к активации ОФ за счет конформационных изменений в линкере, соединяющем каталитический и спиральный домены [31].

Разработка антитоксических препаратов с учетом механизмов проникновения энзиматических единиц токсина в цитозоль клетки

Для получения эффективного антитоксического препарата необходимо учитывать ключевые звенья механизма действия токсина. Принимая во внимание механизмы активации сибиреязвенного токсина становится понятным, что потенциальные антитоксические препараты должны ингибировать: 1) связывание ПА с рецептором клетки; 2) активность внеклеточного фурина, разрезающего ПА на две части массой 20 и 63 kDa; 3) образование олигомерной препоры из мономеров ПА массой 63 kDa; 4) связывание ЛФ или ОФ с ПА; 5) эндоцитоз токсина; 6) превращение олигомерных ПА препор в истинные поры; 7) транслокацию из эндосом ЛФ или ОФ; 8) ферментативную активность ЛФ и ОФ (рис. 6, III обложка) [31].

Разработка препаратов, способных нейтрализовать токсины сибирской язвы, проводится по нескольким направлениям. Одним из подходов к разработке пептидных ингибиторов металлопротеиназы ЛФ является конъюгирование хелатирующих групп металлов с пептидными субстратами, обеспечивающее высокое сродство к активному сайту протеазы. Другим вариантом разработки антитоксических препаратов является проведение скрининга низкомолекулярных органических соединений с целью выявления ингибиторов сибиреязвенных токсинов, эффективность которых улучшают в дальнейшем методами комбинаторной химии [13]. Еще одним направлением является получение моноклональных антител, способных нейтрализовать токсины *B. anthracis*, поиск которых проводят с использованием технологии фагового дисплея [14].

К настоящему времени получено большое количество химерных и гуманизированных моноклональных антител, способных нейтрализовать токсины *B. anthracis*. Действие разработанных моноклональных антител направлено против разных антигенов (ПА, ЛФ, ОФ) и против разных антигенных доменов токсинов. Эпитопная специфичность моноклонального антитела определяет его способность ингибировать ЛТ на этапе сборки, межрецепторных взаимодействий ПА и клетки-мишени, транслокации или проявления ферментативной активности ОФ или ЛФ.

Набольшее количество работ связано с получением антител против ПА *B. anthracis*. Это объясняется тем, что ЛФ и ОФ без ПА не способны проявлять токсический эффект. Кроме того, именно связывание ПА с рецепторами на поверхности эукариотической клетки (TEM8/ANTXR1, CMG2/ANTXR2) является первым событием многоэтапного внутриклеточного проникновения токсина сибирской язвы. Поэтому препараты, ингибирующие межрецепторные взаимодействия ПА с рецепторами эукариотической клетки, будут, вероятно, проявлять особо выраженную эффективность при терапии на ранних стадиях инфекции. Значительная доля ПА связывается с CMG2 рецепторами, поэтому предполагается, что для нейтрализации сибиреязвенного токсина можно заблокировать именно их [29]. В качестве примера можно привести препарат, ингибирующий домен Ville Willebrand фактор А (vWA) сигнального пептида, в сайте которого связывается ПА. Препарат представляет собой растворимые фрагменты домена vWA CMG2 (sCMG2), ингибирующих связывание ПА-рецептора [1, 41]. Однако длительность циркуляции в организме такого рода препарата была незначительной (у крыс период полувыведения препарата всего 10 мин) [42]. Поэтому для решения этой проблемы был сконструирован слитный белок, состоящий из растворимого sCMG2 и Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина — CMG2-Fc, что позволило увеличить период полувыведения препарата до 30 ч [26]. На наш взгляд такого времени циркулирования препарата также недостаточно, однако он может использоваться в целях экстренной профилактики.

На начальных этапах сборки токсина сибирской язвы за счет проявления активности фуриноподобных ферментов происходит отрезание части 1 домена ПА, что запускает следующий этап — сборку препоры. Для ингибирования этого процесса можно получить антитела, блокирующие сайт, на который направлено действие фуриноподобных ферментов. Кроме того, для блокирования сборки токсина можно использовать химические вещества. Например, ярко выраженным ингибирующим действием на фурин обладает 4-гуанидинометилфенил-Arg-Tle-Arg-4-амидинобензиламид (MI-1148). В присутствии ингибиторов фурина значительный защитный эффект наблюдается не только против токсина сибирской язвы, но также и против дифтерийного токсина [17], так как оба токсина имеют схожие стадии проникновения в цитозоль. Возможно ингибирование фурина и является многообещающей стратегией лечения, но, вероятно, только острых инфекционных заболеваний и только в начальном периоде.

Еще одна из стратегий, направленных на ингибирование сборки сибиреязвенных токсинов заключается в ингибировании олигомеризации ПА₆₃. Путем имитации ключевых остатков ПА₆₃, необходимых для межмолекулярных взаимодействий, стабилизирующих гептамер, были синтезированы молекулярные соединения SAVEAT, способные ингибировать олигомеризацию ПА₆₃ и, в итоге, снижать токсичность ЛТ и ОТ [38].

Для ингибирования следующего этапа сборки токсинов — транслокации ЛФ или ОФ сибирской язвы в цитозоль клетки — было получено химерное моноклональное антитело против ПА — sAb29, продуцируемое в генетически модифицированных клетках CHO. Химерное моноклональное антитело sAb29 способно связываться с мономерной или гептамерной формой ПА, предотвращая образование трансмембранной поры ПА. Связывание sAb29 с препорой предотвращает ее переход в истинную пору внутри эндосомы при понижении pH среды, тем самым ингибируя процесс транслокации ЛФ или ОФ в цитоплазму эукариотической клетки. В экспериментах на кроликах было показано, что введение антител sAb29 через 12 ч после заражения *B. anthracis* оказывало терапевтический эффект и все животные выживали [33]. Особенно эффективными оказались антитела к домену 1 ЛФ, способные ингибировать связывание ЛФ и ПА и прохождение в цитозоль ЛФ [10].

Для повышения эффективности моноклональных антител в лечении сибиреязвенной инфекции были проведены эксперименты с использованием коктейля антител против разных эпитопов и разных антигенов *B. anthracis*. Пассивная иммунизация антикапсульными моноклональными антителами защищала животных от инфекции даже при условии введения антител через 20 ч после заражения спорами *B. anthracis* [5].

Активные работы по получению токсин-нейтрализующих моноклональных антител позволили получить препарат Raxibacumab, который в 2012 г. был утвержден FDA в качестве препарата для лечения легочной формы сибирской язвы в сочетании с противомикробными средствами. Raxibacumab является полностью гуманизированным моноклональным антителом к ПА, предотвращающим связывание ПА с клеточным рецептором. Эффективность Raxibacumab (ABthrax) проявляется только на начальных стадиях инфекции, когда ПА находится в растворимой форме, то есть до олигомеризации ПА [25]. Лечебный эффект Raxibacumab был показан на обезьянах, однократное введение препарата которым увеличивало выживаемость до 64% при аэрозольном заражении сибирской

язвой [40]. Безопасность Raxibacumab для людей была подтверждена в клинических испытаниях на 326 здоровых добровольцах. Естественно, тестирование препарата на эффективность у людей не проводилось.

Obiltoxahimab (Anthem[®], ETI-204) является еще одним моноклональным антителом, утвержденным в 2016 г. FDA для профилактики и лечения ингаляционной сибирской язвы. Anthem имеет молекулярную массу около 148 kDa и представляет собой химерное моноклональное антитело к каппа-цепи IgG1 (mAb), которое связывает ПА-компонент токсина *B. anthracis* [15].

Для лечения сибирской язвы в комбинации с антибиотиками используется иммуноглобулин человека «Anthraxisil», полученный у доноров, иммунизированных BioThrax (адсорбированной вакциной против сибирской язвы), из плазмы крови с последующей очисткой [12, 19]. По всей видимости, благодаря присутствию антител, способных реагировать с различными эпитопами ПА, такой препарат может ингибировать токсин даже после этапа связывания ПА с рецептором эукариотической клетки.

Получено большое количество гуманизированных и химерных антител против ЛФ. В качестве особо перспективного препарата себя зарекомендовали моноклональные антитела против 1 домена ЛФ, так как они могут ингибировать связывание ПА и ЛФ и таким образом препятствовать проявлению токсического действия. Например, моноклональное антитело IQNLF является полностью человеческим и направлено против 1 домена ЛФ [2]. В экспериментах на мышах было показано, что однократная иммунизация IQNLF в дозе 180 мкг/мышь защищала всех мышей линии A/J от заражения спорами *B. anthracis* Sterne в дозе 24 LD₅₀ [2]. Получены химерные моноклональные антитела шимпанзе/человек LF10E и LF11H также направлены против 1 домена ЛФ, однако результаты исследований показали, что эти антитела не ингибируют связывание с ПА. Тем не менее, LF10E и LF11H обеспечивают 100% защиту крыс Fischer 344 от действия ЛТ [6].

Полученных моноклональных антител против ОФ мало. Это связано, вероятно, с тем, что ОФ в меньшей степени обуславливает летальный эффект. Одним из косвенных тому подтверждений результаты сравнительных исследований способности нейтрализовать ОФ антителами, находящимися в сыворотках доноров, вакцинированных американской вакциной (anthrax vaccine adsorbed — AVA) или английской вакциной (anthrax vaccine precipitated — AVP). AVA представляет собой бесклеточный фильтрат акапсулярного, токсигенного штам-

ма *B. anthracis* V770-NP1-R, который адсорбируется на гидроксиде алюминия, содержит ПА и только следовые количества антигенов ЛФ и ОФ. Вакцина AVP состоит из бесклеточного фильтрата акапсулярного, токсигенного штамма *B. anthracis* Sterne 34F2, который осаждается сульфатом алюминия (Alum). В отличие от вакцины AVA, AVP содержит все три компонента токсина: ПА, ЛФ и ОФ. Анализ антител в сыворотке крови показал, что у доноров, вакцинированных AVP, уровень антител к ОФ был значительно выше, чем у доноров, вакцинированных AVA. Однако антитела сыворотки крови этих двух групп доноров нейтрализовывали ОТ с одинаковой выраженностью. На этом основании был сделан вывод, что решающая роль в нейтрализации ОФ принадлежит ПА [14].

Несмотря на имеющиеся для профилактики и лечения препараты, направленные на ингибирование токсинов сибирской язвы, продолжение работ в этом направлении необходимо. Raxibacumab и Anthem имеют ряд недостатков. Препараты не способны проникать через гематоэнцефалический барьер, а значит не могут быть использованы для лечения менингеальной формы сибирской язвы, которая часто развивается на поздней стадии инфекции. Побочные эффекты Anthem могут проявляться в виде реакций гиперчувствительности и анафилаксии, поэтому препарат рекомендуется использовать только в случае крайней необходимости. Побочные эффекты Raxibacumab также могут проявляться в виде аллергических реакций. Поэтому перед применением Raxibacumab или Anthem пациентам вводят антигистаминные препараты. Оба препарата должны храниться в холодильнике (при температуре от 2 до 8°C) и не попадать под прямые солнечные лучи. Raxibacumab и Anthem вводятся внутривенно, а в случае биотеррористической атаки предпочтительным является внутримышечный путь введения препарата.

Лечение только антибиотиками эффективно в течение четырех дней после аэрогенного проникновения спор *B. anthracis*. Использование антитоксина вместе с противомикробными препаратами расширяет диапазон эффективного лечения до 1 недели после заражения *B. anthracis* [39].

В России для лечения сибирской язвы в качестве антитоксического препарата выпускается токсин сибирязвенный лошадиный, который может вызывать формирование аллергических реакций. Какие-либо другие отечественные препараты, направленные на ингибирование токсинов сибирской язвы отсутствуют.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных получению человеческих моноклональных антител, способных

нейтрализовать летальный токсин *B. anthracis*, работы в этом направлении продолжаются. Предполагается использование моноклональных антител не только для лечения, но и для проведения специфической профилактики сибирской язвы.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Благодарность

Выражаем благодарность Воеводиной Нине Евгеньевне и Щербаковой Анастасии Николаевне за оказание технической поддержки.

Список литературы/References

1. Abrami L., Leppla S.H., van der Goot F.G. Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J. Cell Biol.*, 2006, vol. 172, no. 2, pp. 309–320. doi: 10.1083/jcb.200507067
2. Albrecht M.T., Li H., Williamson E.D., LeButt C.S., Flick-Smith H.C., Quinn C.P., Westra H., Galloway D., Mateczun A., Goldman S. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, pp. 5425–5433.
3. Benjamin E. Manipulation of host signalling pathways by anthrax toxins. *Turk. Biochem. J.*, 2007, vol. 402, no. 3, pp. 405–417.
4. Chen K.H., Liu S., Leysath C.E., Miller-Randolph S., Zhang Y., Fattah R., Bugge T.H., Leppla S.H. Anthrax toxin protective antigen variants that selectively utilize either the CMG2 or TEM8 receptors for cellular uptake and tumor targeting. *J. Biol. Chem.*, 2016, vol. 291, no. 42, pp. 22021–22029.
5. Chen Z., Moayeri M., Crown D., Emerson S., Gorshkova I., Schuck P., Leppla S.H., Purcell R.H. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, pp. 3902–3908. doi: 10.1128/IAI.00200-09
6. Chen Z., Moayeri M., Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins*, 2011, vol. 3, pp. 1004–1019. doi: 10.3390/toxins3081004
7. Das D., Krantz B.A. Secondary structure preferences of the anthrax toxin protective antigen translocase. *J. Mol. Biol.*, 2017, vol. 429, no. 5, pp. 753–762. doi: 10.1016/j.jmb.2017.01.015
8. Deu E. Proteases as antimalarial targets: strategies for genetic, chemical, and therapeutic validation. *FEBS J.*, 2017, vol. 284, no. 16, pp. 2604–2628. doi: 10.1111/febs.14130
9. Dixon T.C., Meselson M., Guillemin J., Hanna P.C. Anthrax. *N. Engl. J. Med.*, 1999, vol. 341, no. 11, pp. 815–826.
10. Dumas E.K., Garman L., Cuthbertson H., Charlton S., Hallis B., Engler R.J.M., Choudhari S., Picking W.D., James J.A., Farris A.D. Lethal factor antibodies contribute to lethal toxin neutralization in recipients of anthrax vaccine precipitated. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 26, pp. 3416–3422. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.006
11. Fabre L., Santelli E., Mountassif D., Donoghue A., Biswas A., Blunck R., Hanein D., Volkmann N., Liddington R., Rouiller I. Structure of anthrax lethal toxin prepore complex suggests a pathway for efficient cell entry. *J. Gen. Physiol.*, 2016, vol. 148, no. 4, pp. 313–324. doi: 10.1085/jgp.201611617
12. Glinert I., Bar-David E., Sittner A., Weiss S., Schlomovitz J., Ben-Shmuel A., Mechaly A., Altboum Z., Kobiler D., Levy H. Revisiting the concept of targeting only *Bacillus anthracis* toxins as a treatment for anthrax. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 8, pp. 4878–4885. doi: 10.1128/AAC.00546-16
13. Goldberg A.B., Turk B.E. Inhibitors of the metalloproteinase anthrax lethal factor. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2016, vol. 16, no. 21, pp. 2350–2358.
14. Goldstein J.M., Lee J., Tang X., Boyer A.E., Barr J.R., Bagarozzi D.A. Jr, Quinn C.P. Phage display analysis of monoclonal antibody binding to anthrax toxin lethal factor. *Toxins (Basel)*, 2017, vol. 9, no. 7, pp. 221. doi: 10.3390/toxins9070221
15. Greig S.L. Obiltoxaximab: first global approval. *Drugs*, 2016, vol. 76, no. 7, pp. 823–830. doi: 10.1007/s40265-016-0577-0
16. Greither T., Wedler A., Rot S., Keßler J., Kehlen A., Holzhausen H.J., Bache M., Würfl P., Taubert H., Kappler M. CMG2 expression is an independent prognostic factor for soft tissue sarcoma patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 12: E2648. doi: 10.3390/ijms18122648
17. Harges K., Becker G.L., Lu Y., Dahms S.O., Köhler S., Beyer W., Sandvig K., Yamamoto H., Lindberg I., Walz L., von Messling V., Than M.E., Garten W., Steinmetzer T. Novel furin inhibitors with potent anti-infectious activity. *Chem. Med. Chem.*, 2015, vol. 10, no. 7, pp. 1218–1231. doi: 10.1002/cmdc.201500103
18. Hu K., Olsen B.R., Besschetnova T.Y. Cell autonomous ANTXR1-mediated regulation of extracellular matrix components in primary fibroblasts. *Matrix Biol.*, 2017, vol. 62, pp. 105–114. doi: 10.1016/j.matbio.2016
19. Huang E., Pillai S.K., Bower W.A., Hendricks K.A., Guarnizo J.T., Hoyle J.D., Gorman S.E., Boyer A.E., Quinn C.P., Meaney-Delman D. Antitoxin treatment of inhalation anthrax: a systematic review. *Health Secur.*, 2015, vol. 13, no. 6, pp. 365–377. doi: 10.1089/hs.2015.0032
20. Hughes J.M., Gerberding J.L. Anthrax bioterrorism: lessons learned and future directions. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, vol. 8, no. 10, pp. 1013–1014. doi: 10.3201/eid0810.020466
21. Jeong S.Y., Martchenko M., Cohen S.N. Calpain-dependent cytoskeletal rearrangement exploited for anthrax toxin endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 42: E4007–E4015. doi: 10.1073/pnas.1316852110
22. Jia Z., Ackroyd C., Han T., Agrawal V., Liu Y., Christensen K., Dominy B. Effects from metal ion in tumor endothelial marker 8 and anthrax protective antigen: BioLayer Interferometry experiment and molecular dynamics simulation study. *J. Comput. Chem.*, 2017, vol. 38, no. 15, pp. 1183–1190. doi: 10.1002/jcc.24768

23. Jiang J., Pentelute B.L., Collier R.J., Zhou Z.H. Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation. *Nature*, 2015, vol. 521, no 7553, pp. 545–549.
24. Krantz B.A. Anthrax lethal toxin co-complexes are stabilized by contacts between adjacent lethal factors. *J. Gen. Physiol.*, 2016, vol. 148, no. 4, pp. 273–275. doi: 10.1085/jgp.201611681
25. Kummerfeldt E.C. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug Resist.*, 2014, pp. 101–110. doi: 10.2147/IDR.S47305
26. Li L., Guo Q., Liu J., Zhang J., Yin Y., Dong D., Fu L., Xu J., Chen W. Recombinant HSA-CMG2 is a promising anthrax toxin inhibitor. *Toxins (Basel)*, 2016, vol. 8, no. 1: E28. doi: 10.3390/toxins8010028
27. Little S.F., Novak J.M., Lowe J.R., Leppla S.H., Singh Y., Klimpel K.R., Lidgerding B.C., Friedlander A.M. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology*, 1996, vol. 142, pp. 707–715.
28. Liu C.C., Kanekiyo T., Roth B., Bu G. Tyrosine-based signal mediates LRP6 receptor endocytosis and desensitization of Wnt/ β -catenin pathway signaling. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 40, pp. 27562–27570. doi: 10.1074/jbc.M113.533927
29. Liu S., Zhang Y., Hoover B., Leppla S.H. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins (Basel)*, 2012, vol. 5, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.3390/toxins5010001
30. Machen A.J., Akkaladevi N., Trecuzzi C., O’Neil P.T., Mukherjee S., Qi Y., Dillard R., Im W., Gogol E.P., White T.A., Fisher M.T. Asymmetric Cryo-EM Structure of Anthrax Toxin Protective Antigen Pore with Lethal Factor N-Terminal Domain. *Toxins (Basel)*, 2017, vol. 9, no. 10: E298. doi: 10.3390/toxins9100298
31. Maize K.M., Kurbanov E.K., De La Mora-Rey T., Geders T.W., Hwang D.J., Walters M.A., Johnson R.L., Amin E.A., Finzel B.C. Anthrax toxin lethal factor domain 3 is highly mobile and responsive to ligand binding. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2014, vol. 70 (Pt. 11), pp. 2813–2822. doi: 10.1107/S1399004714018161
32. Martchenko M., Jeong S.Y., Cohen S.N. Heterodimeric integrin complexes containing β 1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 35, pp. 15583–15588. doi: 10.1073/pnas.1010145107
33. Mechaly A., Levy H., Epstein E., Rosenfeld R., Marcus H., Ben-Arie E. A novel mechanism for antibody – based anthrax toxin neutralization: inhibition of prepore-to-pore conversion. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 39, pp. 32665–32673. doi: 10.1074/jbc.M112.400473
34. Mogridge J., Cunningham K., Lacy D.B., Mourez M., Collier R.J. The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 10, pp. 7045–7048. doi: 10.1073/pnas.052160199
35. Nestorovich E.M., Bezrukov S.M. Designing inhibitors of anthrax toxin. *Expert Opin. Drug. Discov.*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 299–318. doi: 10.1517/17460441.2014.877884
36. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, 1997, vol. 385, no. 6619, pp. 833–838.
37. Rawlings N.D. Bacterial calpains and the evolution of the calpain (C2) family of peptidases. *Biol. Direct.*, 2015, vol. 10, p. 66. doi: 10.1186/s13062-015-0095-0
38. Rubert Pérez C., López-Pérez D., Chmielewski J., Lipton M. Small molecule inhibitors of anthrax toxin-induced cytotoxicity targeted against protective antigen. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, vol. 79, no. 3, pp. 260–269. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01285.x
39. Rubinson L., Corey A., Hanfling D. Estimation of time period for effective human inhalational anthrax treatment including anti-toxin therapy. *PLoS Curr.*, 2017, vol. 9. doi: 10.1371/currents.outbreaks.7896c43f69838f17ce1c2c372e79d55d
40. Schneemann A., Manchester M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.*, 2009, vol. 4, pp. 35–43. doi: 10.2217/17460913.4.1.35
41. Scobie H.M., Thomas D., Marlett J.M., Destito G., Wigelsworth D.J., Collier R.J., Young J.A., Manchester M. A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 192, no. 6, pp. 1047–1051.
42. Thomas D., Naughton J., Cote C., Welkos S., Manchester M., Young J.A. Delayed toxicity associated with soluble anthrax toxin receptor decoy-Ig fusion protein treatment. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 4: e34611. doi: 10.1371/journal.pone.0034611
43. Van der Goot G., Young J.A. Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol. Aspects Med.*, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 406–412. doi: 10.1016/j.mam.2009.08.007
44. Zakowska D., Bartoszcze M., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Kocik J. New aspects of the infection mechanisms of *Bacillus anthracis*. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 613–618.

Авторы:

Фирстова В.В., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;
Шемякин И.Г., д.б.н., профессор, зам. директора по науке ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия
Дятлов И.А., академик РАН, профессор, д.м.н., директор ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия.

Authors:

Firstova V.V., PhD, MD (Biology), Head Researcher of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation,
Shemyakin I.G., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director for Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation,
Dyatlov I.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.07.2018
 Отправлена на доработку 04.03.2019
 Принята к печати 15.03.2019

Received 25.07.2018
 Revision received 04.03.2019
 Accepted 15.03.2019

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA* *MICHIGANENSIS*

Е.П. Сиволодский^{1,2}, О.А. Фрейлихман²

¹ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Цель исследования — выявить оптимальный объект поиска изолятов *Klebsiella michiganensis*, определить их генетические и фенотипические характеристики, необходимые для идентификации. Объектом исследования были 11 штаммов *Klebsiella oxytoca*, атипичные (отрицательные) по уникальному для клебсиелл маркеру 5-аминосалицилат декарбоксилазе. Они были отобраны для генетического исследования после фенотипического изучения клинических изолятов *K. oxytoca*, выделенных в 2015–2018 гг. в лечебных учреждениях Санкт-Петербурга. В контроле использовали по два клинических штамма *K. oxytoca* и *Raoultella ornithinolytica* с типичными свойствами. Наличие 5-аминосалицилат декарбоксилазы определяли по хромогенной реакции на питательной среде «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ С» (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода выявляли на плотной минимальной синтетической среде с 2 г/л субстрата при инкубации посевов в течение 72 ч при 37°C. Биохимические признаки бактерий изучали микрообъемным методом тест-системой «Рапид-Энтеро» (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). Для генетической характеристики штаммов использовали гены *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB*, *pehX*. Амплификацию фрагментов генов *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB* проводили методом стандартной ПЦР с использованием праймеров, имеющих описанные ранее последовательности. Были амплифицированы два фрагмента гена *rpoB*, общей длиной 834 п.н., фрагмент гена *16SrRNA* длиной 387 п.н., фрагмент гена *gyrA* длиной 441 п.н. Амплифицированные фрагменты секвенировали по Сенгеру на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) с последующим применением методов определения уровней сходства секвенированных фрагментов генов. ПЦР фрагментов гена *pehX* для определения паттерна его амплификации проводили по ранее описанной методике с использованием двух пар праймеров, фланкирующих фрагмент AD длиной 513 п.н. и CD длиной 344 п.н. При изучении 11 штаммов бактерий, идентифицированных ранее как *K. oxytoca*, атипичных (негативных) по маркеру 5-аминосалицилат декарбоксилазе, были выявлены генетическим методом 9 штаммов *K. michiganensis*, 1 штамм-мутант *K. oxytoca* и 1 штамм с высокой степенью гомологии с *Klebsiella kielensis* по нуклеотидной последовательности гена *rpoB*, что подтверждает высокую информативность этого объекта исследования. У 4 штаммов *K. oxytoca* выявлено 99–100% сходства с *K. michiganensis* по всем фрагментам секвенированных генов. Только секвенирование гена *rpoB* обнаружило сходство всех 9 выявленных штаммов с *K. michiganensis*, что позволяет рекомендовать этот подход как наиболее информативный. Наличие гена *pehX*, кодирующего полигалактуроназу, подтверждено методом ПЦР у большинства штаммов *K. michiganensis*, поэтому это исследование нецелесообразно для их идентификации (дифференциации с *K. oxytoca*). Наиболее информативными для фенотипической идентификации *K. michiganensis* являются тесты, по которым боль-

Адрес для переписки:

Фрейлихман Ольга Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-01-08 (служебн.).
E-mail: olga1-7@mail.ru

Contacts:

Olga A. Freylikhman
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-01-08 (office).
E-mail: olga1-7@mail.ru

Библиографическое описание:

Сиволодский Е.П., Фрейлихман О.А. Генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *Klebsiella michiganensis* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 648–654. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-648-654

Citation:

Sivolodskii E.P., Freylikhman O.A. Genetic and phenotypic characteristics of *Klebsiella michiganensis* isolates // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 648–654. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-648-654

шинство штаммов имеют единый профиль: отсутствие 5-аминосалицилат декарбоксилазы, утилизации гистамина, дульцитол, трикарбаллиловой кислоты; наличие продукции индола, утилизации D-мелицитозы, путресцина.

Ключевые слова: *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella kielensis*, *Klebsiella oxytoca*, уникальный фермент клебсиелл 5-АСК декарбоксилаза, секвенирование гена *rpoB*.

GENETIC AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *KLEBSIELLA MICHIGANENSIS* ISOLATES

Sivolodskii E.P.^{a,b}, Freylikhman O.A.^b

^a S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to identify an optimal research target for detection of *Klebsiella michiganensis* isolates, determine their genetic and phenotypic characteristics necessary for identification. Here, we examined 11 *Klebsiella oxytoca* strains, lacking (atypical, negative) a marker 5-aminosalicylate decarboxylase (detected by the chromogenic reaction by 5-aminosalicylic acid) unique for the genus *Klebsiella* bacteria. They were selected for genetic analysis subsequent to a phenotypic characterization of *K. oxytoca* clinical isolates, collected in within 2015–2018 period in medical institutions in St. Petersburg. Two *K. oxytoca* and two *Raoultella ornithinolytica* clinical strains displaying typical properties were used as a control. The presence of 5-aminosalicylate decarboxylase was detected by the chromogenic reaction with the “Klebsiella 5-ASK CHROME C” nutrient medium (Pasteur Institute, St. Petersburg). Substrate utilization as the sole carbon source was detected on a solid minimal synthetic medium added with 2 g/L substrate during incubation for 72 hours at 37°C. Biochemical bacteria features were studied by the microvolume method with the “Rapid-Enterо” test system (Pasteur Institute, St. Petersburg). Genetic strain characterization was performed by estimating *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB* by using a routine PCR with primer sequences described before. Two *rpoB* gene fragments with a total length 834 bp, *16S rRNA* gene fragment — 387 bp, and *gyrA* gene fragment — 441 bp were amplified followed by their sequencing by Singer on an ABI 3130 automatic capillary sequencer (Applied Biosystems, USA) and subsequently determined similarity levels. Amplification pattern for *pehX* gene PCR fragments was performed by using a method described elsewhere with two primer pairs flanking fragment AD with a 513 bp length and 344 bp CD-long motifs. While examining 11 clinical bacterial strains identified earlier as *Klebsiella oxytoca*, lacking (atypical, negative) a 5-aminosalicylate decarboxylase (detected by the chromogenic reaction by 5-aminosalicylic acid) unique for the genus *Klebsiella*, molecular techniques identified 9 *K. michiganensis* strains and 1 strain highly homologous to *Klebsiella kielensis* based on the *rpoB* gene nucleotide sequence, confirming its high informative value. We used the methods for estimating a similarity level for sequenced fragments of *16S rRNA* genes (fragment length 387 bp), *gyrA* gene (fragment length 441 bp), *rpoB* gene (*rpoB-b* and *rpoB-e* with a total fragments length 834 bp), and the analysis of marker amplicon patterns for *pehX* gene (AD, CD). It was shown that for the 4 *K. oxytoca* strains, 99–100% similarity to *K. michiganensis* was identified for all fragments in the sequenced genes. Moreover, similarity of all 9 strains detected with *K. michiganensis* was revealed only in the *rpoB* gene, hereby allowing to recommend it as the most informative approach. The *pehX* gene encoding polygalacturonase was verified by PCR in the majority of *K. michiganensis* strains, pointing that this approach is not rational for their identification (distinguish with *K. oxytoca*). The most informative for the phenotypic identification of *K. michiganensis* are were assays characterized by a common profile for the majority of strains: lack of 5-aminosalicylate decarboxylase, lack of utilized histamine, dulcitol, tricarballylic acid; positive for indole production, as well as D-melezitose and putrescine utilization.

Key words: *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella kielensis*, *Klebsiella oxytoca*, unique *Klebsiella* enzyme 5-aminosalicylate decarboxylase, *rpoB* gene sequencing.

Введение

В последние 5 лет были открыты 3 новых вида клебсиелл, филогенетически связанных с видом *Klebsiella oxytoca*. В 2013 г. было опубликовано описание бактерий нового вида, *Klebsiella michiganensis*, выделенных в штате Мичиган (США) из держателя зубной щетки [8]. Сведений о выделении этих бактерий из клинического материала очень мало. В 2018 г. опубликовано сообщение о выделении у пациента с диареей в больнице университета Чжэцзян (Китай) штамма *K. michiganensis*, продуцирующего три

типа карбапенемаз: KPC-2, NDM-1, NDM-5 [9]. В 2018 г. в Институте Пастера (Париж) был открыт новый вид клебсиелл *Klebsiella grimontii* [7]. Штаммы этого вида выделяли у пациентов с антибиотик-ассоциированным геморрагическим колитом и раневыми инфекциями. В мае 2018 г. исследователи сообщили о выделении в Китае из мочи человека нового вида *Klebsiella huaxiensis* (неопубликованные данные). Ранее нами было установлено, что родоспецифический маркер клебсиелл декарбоксилаза 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК декарбоксилаза) встречается у бактерий *K. oxytoca* реже (88,0±4,9%), чем

у клебсиелл других видов — *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (94,4±2,3%), *K. mobilis* (92,5±4,3) [1]. Это позволило предположить, что среди атипичных (отрицательных по маркеру 5-АСК декарбоксилазе) штаммов *K. oxytoca* могут быть, кроме мутантов по этому признаку, представители новых видов клебсиелл.

Цель исследования — выявить оптимальный объект поиска изолятов бактерий *Klebsiella michiganensis*, определить их генетические и фенотипические характеристики, необходимые для идентификации.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Объектами исследования были 11 штаммов *K. oxytoca* атипичных (отрицательных) по уникальному для клебсиелл маркеру 5-АСК декарбоксилазе. Штаммы были отобраны нами для генетического изучения после фенотипического исследования многочисленных клинических изолятов *K. oxytoca*, выделенных в 2015–2018 гг. в бактериологических лабораториях Военно-медицинской академии, ЗАО «Ситилаб» и других учреждений Санкт-Петербурга. В контроле использовали по два клинических штамма *K. oxytoca* и *Raoultella ornithinolytica* с типичными свойствами. Видовая принадлежность всех используемых штаммов была подтверждена методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS). Все указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии.

Питательные среды. Для культивирования бактерий использовали «Колумбийский агар» (НИЦФ, Санкт-Петербург). 5-АСК декарбоксилазу выявляли по хромогенной реакции на хромогенной питательной среде «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ-С» производства НИИЭМ имени Пастера (Санкт-Петербург) [2]. Биохимические признаки клебсиелл и других энтеробактерий изучали микрообъемным методом с использованием тест-системы «Рапид-Энтеро» производства НИИЭМ имени Пастера (Санкт-Петербург) и микробиологическим анализатором «Vitek 2 Compact» (bioMérieux, Франция). Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода осуществляли на минимальном солевом агаре (г/л): NH_4Cl — 5; NH_4NO_3 — 1; Na_2SO_4 — 2; K_2HPO_4 — 3; KH_2PO_4 — 1; MgSO_4 — 0,1; агар — 15; 1,6%-ный водный раствор бромтимолового синего — 4 мл, дистиллированная вода — 1 л; pH — 7,2; стерилизация при 121°C 20 мин. Каждый субстрат вносили по 0,1 г в отдельную колбу с 50 мл стерильной горячей среды, корректировали pH до значения 7,2, раз-

ливали в чашки Петри. Использовали субстраты: Histidine dihydrochloride, D-Melezitose monohydrate, Tricarballic acid, Putrescine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Швейцария).

Методика определения утилизации субстратов в качестве единственного источника углерода. Суточные агаровые культуры бактерий по полной петле (d = 2 мм) суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85% раствора NaCl в лунках стерильного полимерного планшета. Чашки сред с субстратами (состав сред указан выше) и контрольную среду без субстрата разделяли на 8 секторов и маркировали по номерам штаммов. Засевали исследуемые культуры по полной петле взвеси бактерий из лунки радиальным штрихом на сектор чашки с субстратом и контролем. Посевы выращивали при 37°C в течение 3 суток, просматривая ежедневно. Положительным результатом утилизации субстрата считали наличие четко выраженного газона бактерий по следу посева при отсутствии роста бактерий на контрольной среде без субстрата.

Тест на наличие 5-АСК декарбоксилазы — маркера бактерий рода *Klebsiella*. Исследуемый материал — суточную агаровую культуру бактерий — засевали петлей на поверхность сектора (¼ часть чашки) хромогенной питательной среды «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ С» в виде бляшки диаметром 5–6 мм, инкубировали посев при 37°C в аэробных условиях в течение 24 ч, учитывали результат: появление зоны темно-коричневой окраски питательной среды вокруг газона бактерий на бесцветном фоне среды указывало на наличие у бактерий 5-АСК декарбоксилазы; отсутствие темно-коричневой зоны окраски среды вокруг выросшего газона бактерий указывало на отсутствие у бактерий фермента 5-АСК декарбоксилазы.

Состав среды, методика приготовления и контроля указаны в инструкции по применению, а также в [2].

Идентификация видов бактерий методом MALDI-TOF MS. Использовали настольный MALDI-TOF масс-спектрометр «Microflex» с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Germany) в соответствии с инструкцией по применению.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Выделение ДНК из суспензии колоний бактериальной культуры проводилось методом температурного лизиса по стандартной методике. В качестве мишеней для амплификации были использованы гены *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB*. Амплификацию фрагментов данных генов проводили методом стандартной ПЦР с использованием праймеров, имеющих описанные ранее последовательности, и при описанных ранее условиях. Были амплифицированы два фрагмента гена *rpoB*, общей длиной 834 п.н. [8], фрагмент гена *16S rRNA*,

длиной 387 п.н. [4], фрагмент гена *gyrA* длиной 441 п.н. [3]. Далее полученные фрагменты были использованы для их секвенирования. ПЦР фрагментов гена *pehX* для определения паттерна его амплификации проводилась по ранее описанной методике с использованием двух пар праймеров, фланкирующих фрагменты AD, длиной 513 п.н., и CD, длиной 344 п.н. [5]. ПЦР для каждой мишени проводилась с использованием реакционной смеси объемом 25 мкл, которая содержала 5 мкл универсального 5x Screen Mix (Евроген, Россия), включающего смесь дНТФ, MgCl₂, реакционный буфер и Taq-полимеразу, 15 мкл стерильной деионизированной воды, 1 нМ каждого праймера и 2 мкл ДНК-матрицы.

Секвенирование по Сенгеру. Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили

на капиллярном секвенаторе «ABI 3130» (Applied Biosystems, США) с использованием реакционной смеси «BigDye Terminator v3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Анализ и выравнивание полученных сиквенсов были проведены с помощью программы Geneious v.7, нумерация нуклеотидов и номенклатура мутаций основана на референсной нуклеотидной последовательности *Klebsiella* sp. (код доступа NCBI GenBank No CP020657.1).

Результаты

Изучение уровней сходства нуклеотидной последовательности секвенированных фрагментов генов *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB* выявило среди атипичных по 5-АСК декарбоксилазе штаммов *K. oxytoca* 3 группы по сходству с *K. michiganensis*

Таблица 1. Генетическая характеристика атипичных штаммов *K. oxytoca*

Table 1. Genetic characteristic of *K. oxytoca* atypical strains

Вид, штамм Species, strain	Уровень сходства секвенированных фрагментов генов (%) Similarity levels for sequenced genes fragments (%)								ПЦР-анализ гена <i>pehX</i> * PCR analysis of <i>pehX</i> gene*		
	16S rRNA		<i>gyrA</i>		<i>rpoB-b</i>		<i>rpoB-e</i>		AD	CD	
	К.м.	К.ох.	К.м.	К.ох.	К.м.	К.ох.	К.м.	К.ох.			
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> for all sequenced genes											
<i>K. oxytoca</i> 404	100	100	100	100	100	100	100	100	100	–	–
<i>K. oxytoca</i> 409	100	100	100	100	100	100	100	100	100	–	–
<i>K. oxytoca</i> 31	100	100	100	< 99	99**	100	100	100	100	+	+
<i>K. oxytoca</i> 32	100	100	100	100	99**	100	100	100	< 99	–	+
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> не по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> not for all sequenced genes											
<i>K. oxytoca</i> 1124	100	100	< 99	100	99**	100	< 99	100	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 29	100	100	100	100	100	100	< 99	100	100	+	+
<i>K. oxytoca</i> 41	< 99	100	< 99	100	100	100	100	100	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 2947	< 99	100	< 99	100	100	100	100	100	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 1442	100	100	< 99	100	100	100	100	100	100	–	+
Штаммы, имеющие невысокое сходство с <i>K. michiganensis</i> по секвенированным генам Strains with low similarity with <i>K. michiganensis</i> for sequenced genes											
<i>K. oxytoca</i> 9Б	< 99	100	< 97	99**	< 99	100	< 99	100	100	+	+
<i>K. oxytoca</i> 27	< 99	100	< 97	100	<i>K. kielensis</i> 100	<i>K. kielensis</i> 100	< 99	100	100	+	+
Контрольные штаммы <i>K. oxytoca</i> и <i>Raoultella ornithinolytica</i> Control strains <i>K. oxytoca</i> and <i>Raoultella ornithinolytica</i>											
<i>K. oxytoca</i> 820	< 99	100	< 99	100	< 99	100	< 99	99**	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 862	< 99	100	< 99	100	< 99	100	< 99	100	100	–	+
<i>R. ornithinolytica</i> 1240	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	–	–
<i>R. ornithinolytica</i> 433	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	–	–
Типовой штамм <i>K. michiganensis</i> W14T*** Typical <i>K. michiganensis</i> strain W14T***											
<i>K. michiganensis</i> W14		99		98		97				–	–

Примечание. К.м. — *K. michiganensis*, К.ох. — *K. oxytoca*, **pehX* — ген полигалактуроназы с анализом паттерна маркерных ампликонов AD, CD; **есть уникальные нуклеотидные замены, ***по [8].

Note. К.м. — *K. michiganensis*, К.ох. — *K. oxytoca*, **pehX* — the gene encoding polygalacturonase with the analysis of marker amplicons patterns (AD, CD), ** there are unique nucleotide substitutions, ***according to [8].

(табл. 1). Первая группа (штаммы 404, 409, 31, 32) имела 99–100% сходства с нуклеотидной последовательностью *K. michiganensis* и *K. oxytoca* у всех изученных генов; вторая группа (штаммы 1124, 29, 41, 2947, 1442) имела 99–100% сходства не по всем генам с *K. michiganensis* и 100% сходства с *K. oxytoca*. Третья группа (штаммы 9Б, 27) имела сходство менее 97% с генами *K. michiganensis* и 99–100% сходства с генами *K. oxytoca*, но при этом обнаруживались уникальные однонуклеотидные замены (SNP) в генах *rpoB* и *gyrA* у штамма *K. oxytoca* 9Б: 3 SNP в гене *gyrA* — G > A в положении 2390 п.н., T > C в положении 2393 п.н., C > T в положении 2396 п.н.

Штамм *K. oxytoca* 27 имел в фрагменте гена *rpoB* (*rpoB-b*) 100% сходство последовательностей с *K. kielensis*. Контрольные штаммы типичных *K. oxytoca* имели 99–100% сходства только с последовательностями генов *K. oxytoca*.

Контрольные штаммы *R. ornithinolytica* имели невысокое сходство (менее 99%) с генами *K. michiganensis* и *K. oxytoca*, но имели 100% сходства с последовательностями генов *R. ornithinolytica*.

Изучение у штаммов *K. michiganensis* и *K. oxytoca* методом ПЦР паттернов амплификации гена *pehX*, кодирующего полигалактуроназу (гидролиз пектина), показало, что амплификация этого гена не воспроизводится у некоторых штаммов, что предположительно связано с полной или частичной делецией гена.

Все выявленные штаммы *K. michiganensis* имели характерные для клебсиелл признаки. Их культуральные и биохимические свойства соответствовали, в основном, типовому штамму этого вида [8]. Однако, отмечена вариабельность штаммов по гидролизу мочевины, не обнаружены штаммы отрицательные по утилизации путресцина. Важным для идентификации

Таблица 2. Фенотипическая характеристика штаммов *K. michiganensis* и атипичных *K. oxytoca*

Table 2. Phenotypic characteristic of *K. michiganensis* strains and *K. oxytoca* atypical strains

Вид, штамм Species, strain	Вид по MALDI-TOF MS** Species by MALDI-TOF MS**	5-АСК декарбоксилаза 5-ASA decarboxylase	Индол Indole	Уреаза Urease	Утилизация Utilization				
					Гн Hn	Мц D Mc D	Дц Dc	Тк Ta	Пц Pc
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> for all sequenced genes									
<i>K. michiganensis</i> 404	<i>K. oxytoca</i>	–	+	–	–	+	–	–	+
<i>K. michiganensis</i> 409	<i>K. oxytoca</i>	–	+	–	–	+	–	–	+
<i>K. michiganensis</i> 31	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	–	+
<i>K. michiganensis</i> 32	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	–	+
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> не по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> not for all sequenced genes									
<i>K. michiganensis</i> 1124	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	+	+
<i>K. michiganensis</i> 29	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	+	+	+
<i>K. michiganensis</i> 41	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	–	–	+	+
<i>K. michiganensis</i> 2947	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	–	+	+	+
<i>K. michiganensis</i> 1442	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	–	+	+	+
Штаммы, имеющие невысокое сходство с <i>K. michiganensis</i> по секвенированным генам Strains with low similarity with <i>K. michiganensis</i> for sequenced genes									
<i>K. oxytoca</i> 9Б	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	+	+
<i>K. oxytoca</i> 27	<i>K. oxytoca</i>	–	+	–	–	–	–	+	+
Контрольные штаммы <i>K. oxytoca</i> и <i>Raoultella ornithinolytica</i> Control strains <i>K. oxytoca</i> and <i>Raoultella ornithinolytica</i>									
<i>K. oxytoca</i> 820	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>K. oxytoca</i> 862	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>R. ornithinolytica</i> 1240	<i>R. ornithinolytica</i>	–	+	+	+	–	–	–	+
<i>R. ornithinolytica</i> 433	<i>R. ornithinolytica</i>	–	+	+	+	–	–	–	+
Типовой штамм <i>K. michiganensis</i> W 14Т*** Typical <i>K. michiganensis</i> strain W14Т***									
<i>K. michiganensis</i> W14т	<i>K. oxytoca</i> (score 1.998)	*	+	–	–	+	–	*	–

Примечание. Гн — гистамин, Мц D — D-мелицитоза, Дц — дульцит, Тк — трикарбаллиловая кислота, Пц — путресцин; *неизвестно, **в базе данных нет *K. michiganensis*, ***по [8].

Note. Hn — histamine, Mc D — D-melezitose, Dc — dulcitol, Ta — tricarballylic acid, Pc — putrescine;

*unknown, ***K. michiganensis* is absent in the database, ***according to [8].

K. michiganensis является их отношение к утилизации гистамина, D-мелицитозы, дульцитола, трикарбаллиловой кислоты, путресцина. Штаммы *K. michiganensis*, имеющие высокий уровень сходства по всем фрагментам секвенированных генов, имели одинаковый профиль по этим субстратам (табл. 2). Остальные штаммы этого вида имели различные варианты профилей.

Обсуждение

Наличие у 4 атипичных штаммов *K. oxytoca* (404, 409, 31, 32) 99–100% сходства с *K. michiganensis* и *K. oxytoca* по всем фрагментам секвенированных генов в сочетании с единым профилем фенотипических признаков (отсутствие 5-АСК декарбоксилазы; утилизации гистамина, дульцита, трикарбаллиловой кислоты; наличие продукции индола, утилизации D-мелицитозы, путресцина) позволяет идентифицировать их как вид *K. michiganensis*. Указанные фенотипические признаки совпадают с признаками типового штамма *K. michiganensis* W 14T, за исключением тех, которые отсутствуют в описании типового штамма [8].

Штаммы второй группы (1124, 29, 41, 2947, 1442), имеющие 99–100% сходства с *K. michiganensis* и *K. oxytoca* только по секвенированному фрагменту гена *rpoB* (*rpoB-b*), различались также по утилизации дульцита и D-мелицитозы. Поэтому мы рассматриваем эти штаммы как варианты вида *K. michiganensis*. Так как все 9 штаммов *K. michiganensis* были выявлены методом секвенирования гена *rpoB*, мы считаем этот подход наиболее информативным для их идентификации. Бактерии вида *K. michiganensis* выявлены нами впервые в России.

Штамм 9Б является видом *K. oxytoca*, так как имеет только 97% сходства с генами *K. michiganensis* и 99–100% сходства с генами *K. oxytoca*.

Его атипичность, возможно, связана с тремя SNP в гене *gyrA*. Фенотипические признаки его соответствуют виду *K. oxytoca*.

Штамм *K. oxytoca* 27 неожиданно показал в фрагменте гена *rpoB* (*rpoB-b*) 100% сходства последовательностей с бактериями вида *K. kielenensis*. Вид *K. kielenensis* пока представлен только отдельными нуклеотидными последовательностями в базе данных NCBI GenBank (идентификатор txid 20423021).

Описание этого вида пока не опубликовано. Поэтому этот штамм имеет научное значение для характеристики нового вида клебсиелл.

Исследование методом ПЦР паттернов амплификации гена *pehX*, кодирующего полигалактуроназу (гидролиз пектина), показало его наличие у большинства штаммов *K. michiganensis* и всех штаммов *K. oxytoca*, что определяет нецелесообразность этого исследования для дифференциации указанных видов.

Все 9 штаммов *K. michiganensis* были идентифицированы методом MALDI-TOF при сравнении с типовым штаммом *K. oxytoca* ATCC 13182T базы данных как вид *K. oxytoca* с низким уровнем вероятности вида (score 1.870–1.977). Эти данные полностью совпадают с характеристикой типового штамма *K. michiganensis* W14T, который был идентифицирован методом MALDI-TOF MS с тем же типовым штаммом сравнения базы данных как *K. oxytoca* с низким уровнем вероятности вида (score 1.998). Однако при использовании некоторых других нетиповых штаммов сравнения базы данных все 9 штаммов *K. michiganensis*, были определены как вид *K. oxytoca* с высокой вероятностью вида (score > 2.300). Вероятно, среди штаммов сравнения базы данных были штаммы *K. michiganensis*, которые трактовались как *K. oxytoca*. Примером пересмотра видовой принадлежности *K. oxytoca* на вид *K. michiganensis* является штамм *K. oxytoca* E718 [6]. Штамм был выделен в 2010 г. на Тайване у больного после операции на печени, отличался наличием R-плазмиды с геном NDM-1 карбапенемазы. Полная последовательность генома и плазмиды штамма *K. oxytoca* E178 была депонирована в 2012 г. в NCBI GenBank. После открытия *K. michiganensis* видовая принадлежность штамма была пересмотрена и в NCBI GenBank он обозначен как *K. michiganensis* E718 (NCBI GenBank No CP003681).

По нашим данным наиболее важным признаком *K. michiganensis* является отсутствие уникального фермента клебсиелл 5-АСК декарбоксилазы, который определяет хромогенную реакцию с 5-АСК в питательной среде [1, 2]. Этот признак имеет 100% специфичность, так как за период тридцатилетних наблюдений не выявлено ни одного ложноположительного результата у других видов бактерий. У некоторых штаммов клебсиелл (4–12%) отсутствует 5-АСК декарбоксилаза как результат естественной изменчивости или ошибочного причисления к клебсиеллам бактерий других родов со схожим фенотипом: например, бактерии рода *Raoultella* ранее считали клебсиеллами. В данном исследовании были выявлены 9 штаммов *K. michiganensis* при изучении 11 штаммов *K. oxytoca* атипичных (негативных) по 5-АСК декарбоксилазе. Поэтому оптимальным объектом поиска изолятов *K. michiganensis* являются бактерии с фенотипом *K. oxytoca*, негативные по хромогенной реакции с 5-АСК в питательной среде. Для идентификации *K. michiganensis* эти штаммы следует исследовать методом секвенирования гена *rpoB* (*rpoB-b*) [8] и определять профиль их фенотипических признаков (продукцию индола, утилизацию гистамина, D-мелицитозы, дульцита, путресцина, трикарбаллиловой кислоты).

Благодарности

Авторы благодарят врачей-бактериологов Домакову Т.В. (ЗАО «Ситилаб»), Горелову Г.В., Бого-

словскую С.П. (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) и д.м.н. Краеву Л.А. (НИИЭМ им. Пастера) за клинические штаммы *K. oxytoca*, предоставленные для исследования.

Список литературы/References

1. Сиволодский Е.П. Специфическое свойство бактерий рода *Klebsiella* — цветная реакция с 5-аминосалициловой кислотой в питательной среде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988. № 12. С. 26–29. [Sivolodskii E.P. A specific property of bacteria in the genus *Klebsiella* — a color reaction with 5-aminosalicylic acid in the nutrient medium. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1988, no. 12, pp. 26–29. (In Russ.)]
2. Сиволодский Е.П. Хромогенная синтетическая питательная среда «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ С» для выделения и идентификации клебсиелл // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 5. С. 48–51. [Sivolodskii E.P. The chromogenic synthetic medium «*Klebsiella* 5-ASA CHROM C» for isolation and identification of *Klebsiellae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 12, pp. 48–51. (In Russ.)]
3. Brisse S., Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, vol. 51, pp. 915–924. doi: 10.1099/00207713-51-3-915
4. Granier S., Plaisance L., Leflon-Guibout V., Lagier E., Morand S., Goldstein F., Nicolas-Chanoine M. Recognition of two genetic groups in the *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of chromosomal β -lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, vol. 53 (pt. 3), pp. 661–668. doi: 10.1099/ijss.0.02408-0
5. Kovtunovych G., Lytvynenko T., Negrutka V., Lar O., Brisse S., Kozyrovska N. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Res. Microbiol.*, 2003, vol. 154, pp. 587–592. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00148-7
6. Liao T.L., Lin A.C., Chen E., Huang T.W., Liu Y.M., Chang Y.H., Lei J.F., Lauderdale T.L., Wang J.T., Chang S.L., Tsai S.F., Chen Y.T. Complete genome sequence of *Klebsiella oxytoca* E718, a New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing nosocomial strain. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 19, pp. 5454. doi: 10.1128/JB.01216-12
7. Passet V., Brisse S. Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, pp. 377–381. doi: 10.1099/ijsem.0.002517
8. Saha R., Farrance Ch.E., Verghese B., Hong S., Donofrio R. *Klebsiella michiganensis* sp. nov. a new bacterium isolated from a tooth brush holder. *Curr. Microbiol.*, 2013, vol. 66, pp. 72–78. doi: 10.1007/s00284-012-0245-x
9. Zheng B., Xu H., Ya X., Lv T., Jiang X., Cheng H., Zhang J., Chen Y., Huang C., Xiao Y. Identification and genomic characterization of a RPC-2-, NDM-1- and NDM-5-producing *Klebsiella michiganensis* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2018, vol. 73, no. 2, pp. 536–538. doi: 10.1093/jac/dkx415

Авторы:

Сиволодский Е.П., д.м.н., профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; **Фрейлихман О.А.**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sivolodskii E.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology S.M. Kirov Military Medical Academy, St.Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biological Techniques, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; **Freylikhman O.A.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biological Techniques, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.10.2018
Отправлена на доработку 17.04.2019
Принята к печати 28.06.2019

Received 24.10.2018
Revision received 17.04.2019
Accepted 28.06.2019

ОСОБЕННОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2) ЧЕЛОВЕКА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ПЕРИОД 2016–2018 ГГ.

П.А. Петрова, Н.И. Коновалова, А.Д. Васильева, Е.М. Еропкина, А.А. Иванова,
А.Б. Комиссаров, М.Ю. Еропкин, Д.М. Даниленко

ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Вирусы гриппа А(Н3N2) демонстрируют самый высокий уровень эволюционной изменчивости по сравнению с другими вирусами гриппа, циркулирующими в человеческой популяции. Штаммы данного подтипа поражают большое количество лиц, относящихся к группам повышенного риска: детей младше трех лет, беременных женщин, лиц старше 65 лет, медицинских работников, а также лиц, имеющих хронические заболевания нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Вирусы А(Н3N2) вызывают значительное количество смертельных случаев среди лиц старше 65 лет. Штаммы данного подтипа вызывают наиболее тяжелые случаи гриппозной инфекции, сопровождающиеся серьезными осложнениями. В статье представлены результаты анализа антигенных и других биологических свойств циркулирующих вирусов гриппа человека А(Н3N2) на территории России в эпидемических сезонах 2016–2018 гг. Представлены данные активности нейраминидазы (NA) современных вирусов гриппа А(Н3N2), полученные MUNANA-тестом, выделенных на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1, проанализирована роль аминокислотных замен в NA в зависимости от системы выделения штаммов. В связи с изменениями рецепторных свойств вирусов важным является подбор оптимальных условий выделения. Нами были выбраны клеточные культуры, рекомендованные ВОЗ, которые различаются по своим рецепторным свойствам. Проведена оценка эффективности выделения вирусов данного подтипа на клеточных линиях MDCK и MDCK-Siat1. Установлено, что эффективность выделения вирусов гриппа А(Н3N2) на клеточной культуре MDCK-Siat1 составила 77,3%, а на MDCK — 71,3%. Показано, что большинство выделенных изолятов (68,6% в 2016–2017 гг. и 44,6% в 2017–2018 гг.) имеют NA-индуцированную агрегацию эритроцитов. Установлено, что современные российские штаммы данного подтипа не имеют существенных антигенных отличий при выделении и пассировании на различных клеточных культурах, однако возможно появление адаптационных замен в нейраминидазе. При изучении антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2) методом РТГА и реакцией микронеутрализации (cell-ELISA) отмечено, что большинство штаммов, выделенных в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг., были антигенно родственны референс-штамму А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016 (MDCK-Siat1) и взаимодействовали с антисывороткой к нему до гомологичного титра. По результатам секвенирования установлено,

Адрес для переписки:

Петрова Полина Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ.
Тел.: 8 952 233-36-21 (моб.).
E-mail: suddenkovapolina@gmail.com

Contacts:

Polina A. Petrova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str.,
15/17, Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone: +7 952 233-36-21 (mobile).
E-mail: suddenkovapolina@gmail.com

Библиографическое описание:

Петрова П.А., Коновалова Н.И., Васильева А.Д., Еропкина Е.М.,
Иванова А.А., Комиссаров А.Б., Еропкин М.Ю., Даниленко Д.М.
Особенности современных вирусов гриппа А(Н3N2) человека,
циркулировавших на территории России в период 2016–
2018 гг. // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 655–664.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-655-664

Citation:

Petrova P.A., Konovalova N.I., Vassilieva A.D., Eroпкиna E.M., Ivanova A.A.,
Komissarov A.B., Eroпкиn M.Yu., Danilenko D.M. Features 2016–2018 current
human influenza A(H3N2) viruses circulating in Russia // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6,
pp. 655–664. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-655-664

Работа выполнена при поддержке гранта NU51P000854-01 «Поддержание потенциала по надзору за гриппом»,
а также стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018).

что в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. на территории России были выявлены вирусы субклайда 3С.2а2, а также 3С.2а3 и 3С.2а1b. Таким образом, была выявлена нарастающая генетическая гетерогенность вирусов А(Н3N2) на территории России.

Ключевые слова: вирусы гриппа А(Н3N2), реакция торможения гемагглютинации, реакция микронеutralизации, антигенные свойства, генетические свойства, MUNANA-тест.

FEATURES 2016–2018 CURRENT HUMAN INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES CIRCULATING IN RUSSIA

Petrova P.A., Konovalova N.I., Vassilieva A.D., Eroпкина E.M., Ivanova A.A., Komissarov A.B., Eroпкин M.Yu., Danilenko D.M.

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

Abstract. Influenza A(H3N2) viruses demonstrate the highest level of evolutionary variability compared to other influenza viruses circulating in human population. The strains of this subtype affect a large number of people belonging to high-risk groups: children under three years of age, pregnant women, people over 65 years, medical professionals, and persons with chronic nervous, cardiovascular and respiratory diseases. Influenza A(H3N2) viruses result in high mortality rate in subjects over 65 years causing the most severe course, accompanied by serious complications. Here, we present the data on analyzing antigenic and biological properties of human influenza A(H3N2) viruses which circulated in 2016–2018 epidemic seasons in Russia. The data on the neuraminidase activity (MUNANA test) of recent influenza A(H3N2) viruses isolated on MDCK and MDCK-Siat1 cell cultures are presented to compare with NA sequencing data in order to assess possible influence of the isolation system on NA activity. Due to changes in virus receptor properties, a choice of optimal isolation conditions is of high importance. The WHO recommended cell cultures differing in receptor properties were used. Efficiency of virus isolation on MDCK and MDCK-Siat1 cell lines was also analyzed. It has been established that the efficiency of influenza A(H3N2) virus isolation in MDCK-Siat1 cell culture was 77.3%, whereas in MDCK — 71.3%. It was shown that the majority of isolated strains (68.6% in 2016–2017 and 44.6% in 2017–2018) exhibited a NA-induced erythrocyte agglutination. It was found that current A(H3N2) strains isolated in Russia displayed no significant antigenic differences regardless of cell cultures used; however, adaptive substitutions in neuraminidase may emerge. While studying antigenic properties of influenza A(H3N2) viruses by using the HI assay and the microneutralization assay (cell-ELISA), it was noted that the majority of strains isolated in the 2017–2018 epidemic season was antigenically related and interacted with antiserum against the reference strain A/Singapore/INFIMH-16–0019/2016 (MDCK-Siat1) at a homologous titer. According to the sequencing data, it was established that during the 2017–2018 epidemic season, viruses of subclade 3С.2а2, as well as 3С.2а3 and 3С.2а1b were detected in Russia. Thus, an increasing genetic heterogeneity of A(H3N2) viruses was revealed in Russia.

Key words: influenza A(H3N2) viruses, hemagglutination inhibition test, microneutralization, antigenic properties, genetic properties, MUNANA-assay.

Введение

В последние восемь эпидемических сезонов вирусы гриппа А(Н3N2) ежегодно циркулируют совместно с вирусами подтипа А(Н1N1)pdm09, а также двумя линиями вирусов гриппа В — Викторианской и Ямагатской. Во многих странах мира вирусы гриппа А(Н3N2) часто становятся доминирующим подтипом среди всех циркулирующих вирусов гриппа и вызывают наиболее тяжелые случаи гриппозной инфекции, сопровождающиеся серьезными осложнениями, такими как пневмония, синдром Рея, Киша, Уотерхауса–Фридериксена и т.д. Так, в США в сезоне 2017–2018 гг. зарегистрирована эпидемия высокой степени тяжести, связанная с доминированием в структуре циркулирующих вирусов гриппа А(Н3N2), которые составили 84,9% [3]. Схожая ситуация отмечена и в Австралии в сезоне 2017 г., когда интенсивность эпидемии гриппа, вызванной вирусами А(Н3N2), превы-

шала показатели, отмеченные в пандемию 2010 г. [2]. При этом было зафиксировано увеличение количества госпитализаций и смертности [2].

Вирусы гриппа А демонстрируют высокий уровень изменчивости. Ежегодно во всем мире наблюдается постоянный антигенный дрейф вирусов А(Н3N2). Наиболее подвержены антигенному дрейфу поверхностные белки — гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA). Высокий уровень изменчивости позволяет вирусу уклоняться от иммунной системы хозяина. Как следствие, имеющиеся вакцины не обеспечивают долговременной протекции, а их состав ежегодно пересматривается экспертами Глобальной сети эпидемического надзора за гриппом ВОЗ (GISRS) и обновляется с учетом данных об антигенных и генетических особенностях штаммов, циркулирующих в мире за предшествующие полгода [20, 21].

Гемагглютинин и нейраминидаза выполняют определенные комплементарные роли на раз-

личных этапах развития вирусной инфекции. Аминокислотные замены, возникающие в этих гликопротеинах, оказывают существенное влияние на антигенные и биологические свойства штаммов. Для HA и NA вирусов гриппа А(Н3N2) данные изменения регистрируются значительно чаще, чем в тех же белках вирусов подтипа А(Н1N1)pdm09, а также обеих линиях гриппа В. Клеточные рецепторы, к которым имеют средство вирусы гриппа, представлены двумя видами, отличающимися между собой расположением гликозидной связи между сиаловой кислотой и терминальной галактозой: $\alpha 2,3$ (Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal) и $\alpha 2,6$ (6'SLN; Neu5Ac $\alpha 2$ -6Gal $\beta 1$ -4GlcNAc) [16]. Рецепторы $\alpha 2,3$ наиболее широко представлены в пищеварительном тракте птиц. У людей в верхних дыхательных путях находится большое количество $\alpha 2,6$ -рецепторов, а в нижних дыхательных путях — в бронхиальном эпителии преобладают $\alpha 2,3$ -сиаловые кислоты [13]. Инфекции, вызванные сезонными вирусами гриппа у человека, преимущественно протекают легко, без выраженных осложнений. Однако заболевания, вызванные вирусами гриппа птичьего происхождения, протекают всегда тяжело для пациента из-за вовлечения и распространения вирусов в нижних дыхательных путях. Вследствие постоянного высокого уровня антигенного дрейфа у представителей данного подтипа возникли изменения связывания клеточных рецепторов. За последние 25 лет вирусы А(Н3N2) полностью утратили способность связываться с $\alpha 2,3$ типом рецепторов, что подтверждается полным отсутствием взаимодействия с эритроцитами кур и индеек [8]. Изменение рецепторной специфичности влияет и на эффективность выделения и антигенный анализ вирусов А(Н3N2). Клетки MDCK, содержащие оба типа рецепторов — $\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$, традиционно используются для выделения вирусов гриппа А и В. Отмечено, что эффективность выделения вирусов гриппа А(Н3N2) в данной клеточной системе по сравнению с вирусами А(Н1N1)pdm09 и В с каждым годом снижается. В то же время вирусы А(Н3N2) приобретают компенсаторные мутации, позволяющие им эффективнее реплицироваться в культуре клеток MDCK при лабораторном культивировании. К сожалению, эти мутации влияют и на результаты, получаемые в ходе оценки антигенных свойств вирусов в реакции торможения гемагглютинации, что недопустимо при отборе штаммов-кандидатов для производства гриппозных вакцин [7, 20, 21].

Высокая генетическая и антигенная гетерогенность популяции вирусов гриппа данного подтипа, диктует необходимость глубокого анализа циркулирующих штаммов для формирования верного прогноза при выборе вакцинного штамма [20, 21, 22].

Целью настоящей работы было изучение особенностей выделения на клеточных линиях MDCK и MDCK-Siat1 и антигенный анализ российских изолятов А(Н3N2) в эпидемические сезоны 2016–2018 гг. с учетом новых свойств этого подтипа вирусов гриппа.

Материалы и методы

Материалы для выделения вирусов гриппа (назофарингеальные мазки, секционные материалы) были получены из больниц и поликлиник Санкт-Петербурга, а также из базовых вирусологических лабораторий, расположенных в основных крупных городах страны, находящихся в различных федеральных округах.

Выделение вирусов гриппа производили на клеточных культурах MDCK FR-58 London Line и MDCK-Siat1, полученных из Сотрудничающего Центра (СЦ) по гриппу ВОЗ в Лондоне (Великобритания).

Культивирование клеток. Пересев монослойных клеточных линий осуществлялся на 7–8 сутки в среде альфа МЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (Биолот, кат. номер 1.1.8.1). Посевная концентрация составляла $2,5\text{--}5,0 \times 10^5$ кл/мл.

Выделение вирусов гриппа. Монослой клеток MDCK и MDCK-Siat1, находящийся в специальных пластиковых пробирках со скошенным дном (Nunc, Дания), двукратно отмывали средой альфа-МЕМ (с антибиотиками и ТРСК-трипсином) по 2 мл. Материалы от больных вносили по 0,2 мл в 3 флакона с культурой клеток и после инкубации 30–40 мин при 34°C добавляли 1,8 мл поддерживающей среды. После этого флаконы инкубировали при 34°C, ежедневно контролируя состояние монослоя. При отсутствии выраженного цитопатического действия (ЦПД) пробы выдерживали при 34°C до 6 суток.

Реакцию гемагглютинации и реакцию торможения гемагглютинации ставили по стандартной методике, рекомендуемой ВОЗ, с использованием 0,75% взвеси эритроцитов человека I (0) группы. В реакции торможения гемагглютинации в качестве буфера использовали физиологический раствор, содержащий 20 нМ озельтамивира карбоксилата (Roche, Германия) [9].

Реакцию микронейтрализации выполняли по стандартной методике, рекомендуемой ВОЗ, с использованием моноклональных антител к NP вирусов гриппа типа А, конъюгированных с пероксидазой хрена, полученных в ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России [9].

Определение активности нейраминидазы проводили по методике, рекомендованной ВОЗ [12] с использованием коммерчески доступно-

го субстрата MUNANA (Sigma, Германия, кат. номер M8639). По результатам калибровочной кривой вычисляли значение активности фермента, выраженное в мкмоль 4-метилумбеллиферола — флуоресцирующего продукта реакции/мл × мин.

Экстракция нуклеиновых кислот проводилась с использованием коммерческого набора «QIAamp Viral RNA Mini kit» (Qiagen, Германия).

ОТ-ПЦР для амплификации фрагментов нейраминидазы проводилась с использованием набора реагентов «AgPath-ID One-step RT-PCR Kit» (Ambion, США), амплификацию проводили в термоциклере «BioRad CFX96» (BioRad, США).

Секвенирование NA проводили методом Сэнгера с использованием коммерчески доступного набора реагентов «ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидных последовательностей производилось 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов «ABI 3100 avant» и «ABI 3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводился в полимере POP-6 и POP-7 (Applied Biosystems, США).

Животные. Для получения диагностических сывороток были использованы белые беспородные крысы возраста 6–8 недель, массой 150–200 г, полученные из питомника АМН РФ «Рапполово».

Сыворотки. Для идентификации изолятов были использованы гипериммунные диагностические сыворотки крови овец и крупного рогатого скота, ежегодно предоставляемые ВОЗ. Для реакции торможения гемагглютинации и реакции микронеutralизации применялись поликлональные крысиные антисыворотки, полученные к референс- и эпидемическим штаммам вирусов гриппа подтипа А(Н3N2). Все процедуры по работе с животными выполнены согласно утвержденному Плану и Стандартным Операционным Процедурам лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа. Животные содержались в стандартных условиях, которые соответствовали нормативам, изложенным в Приказе Минздрава от 12.08.1977 № 755 «Правила поведения работ с использованием экспериментальных животных», Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев СП 2.2.1.3218-14 РФ, утв. 29 августа 2014 г. № 51. Этические нормы обращения с животными соблюдались в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (СПб., Rus-LASA, 2012. 48 с.) и European Convention for the Protection Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes.

ETS No. 123. Получение сывороток выполнялось по методике, представленной в работе [1], путем внутрибрюшинной четырехкратной иммунизации с интервалом в 3–4 дня. По окончании иммунизации через 10 дней всех животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом путем тотального забора крови из сердца. Категория боли, испытываемая животными, облегчалась надлежащим способом (D). Для антигенного анализа также использовались хорьковые поликлональные антисыворотки, любезно предоставленные для исследования Dr. J. McCauley (СЦ ВОЗ, Лондон, Великобритания).

Результаты и обсуждение

Выделение вирусов гриппа А(Н3N2)

Известно, что клеточная культура MDCK несет на себе рецепторы двух разновидностей — $\alpha 2,3$ -SA и $\alpha 2,6$ -SA, и поэтому является универсальной клеточной линией для выделения вирусов гриппа всех типов и подтипов. Однако распределение данных типов рецепторов неравномерно: рецепторов типа $\alpha 2,6$ значительно меньше, чем $\alpha 2,3$ [10]. Наблюдается тенденция к тому, что штаммы А(Н3N2) в последние годы слабо выделяются на клеточной культуре MDCK или же имеют низкие гемагглютинирующие титры, которые не удается существенно увеличить в результате дальнейшего пассирования [8, 10]. В последние годы ВОЗ рекомендует использовать клеточную культуру MDCK-Siat1 для выделения и пассирования вирусов гриппа А(Н3N2). Данная культура получена М. Matrosovich и соавт. в результате трансфекции клеток MDCK кДНК 2,6-сиалилтрансферазы человека (SIAT1). В результате этих изменений клетки экспрессируют в 2 раза больше $\alpha 2,6$ -связанных сиаловых кислот и в 2 раза меньше $\alpha 2,3$ -связанных сиаловых кислот, чем исходные клетки MDCK [10].

Для оценки эффективности репродукции вирусов гриппа А(Н3N2) были взяты 150 образцов материала от больных, положительных в реакции ПЦР на РНК вируса гриппа А(Н3N2) для параллельного выделения штаммов на культурах клеток MDCK и MDCK-Siat1. В результате было выделено 107 штаммов на MDCK и 116 штаммов на MDCK-Siat1. Эффективность выделения вирусов гриппа А(Н3N2) на клеточной культуре MDCK-Siat1 составила 77,3%, а на MDCK — 71,3%. Важно отметить, что у многих штаммов, изолированных на клеточной культуре MDCK-Siat1, в результате пассирования наблюдалось существенное увеличение гемагглютинирующих титров в отличие от MDCK-вариантов. Часть штаммов, выделенных на MDCK-Siat1, не имели гемагглютинирующих титров, но оказывали ярко вы-

раженное цитопатическое действие на клетки. При последовательном пассировании данных штаммов гемагглютинирующий титр достигал показателей не более чем 1:4. Для антигенной характеристики изолятов, не имеющих титра, использовалась реакция микронеutralизации.

Известно, что выделение вирусов гриппа А(Н3N2) на клеточной культуре MDCK приводит к появлению и накоплению адаптационных мутаций. Данные мутации возникают в NA вирионов в положениях D151G/N и T148I [6, 7]. По результатам глубокого секвенирования гена NA из клинических материалов, полученных от госпитализированных пациентов, больных гриппом, было показано, что данные аминокислотные замены встречаются достаточно редко [17], что указывает на то, что эти мутации являются приспособительными и возникают в ходе выделения вирусов гриппа на клеточных культурах. Это подтверждают данные секвенирования гена NA вирусов гриппа, выделенных в клеточной культуре: спустя один пассаж результаты секвенирования демонстрируют наличие смешанной популяции вирусов: D151 + G151 и D151 + N151 [18]. Положение 151 в молекуле NA до недавнего времени считалось высококонсервативным, так как находится в каталитическом центре белка. Мутация D151G приводит к потере каталитической активности NA, но дает возможность тетрамеру связываться с рецепторами клетки, вероятно, за счет присутствующего на нем сайта, ответственного за гемадсорбцию. Нейраминидаза вирусов, содержащая замены в 148 и 151 положениях, проявляет аффинность к $\alpha 2,3$ -клеточным рецепторам. К.С. Хуе и соавт.

отмечают, что смешанные популяции вирусов гриппа А(Н3N2) гораздо лучше пассируются и имеют более высокие титры, чем чистые популяции [18]. При этом различные генетические варианты по данной позиции не вытесняют друг друга, так как один вариант имеет преимущество при выходе вирионов из зараженной клетки, а другой вариант имеет способность связываться с клеточными рецепторами [18]. Способность NA взаимодействовать с сиаловыми кислотами на поверхности клеток-мишеней очень сильно искажает результаты реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации. При добавлении 20 нМ раствора озельтамивира карбоксилата блокируется активность NA, и, как следствие, исчезает ложноположительная NA-индуцированная агглютинация эритроцитов. При отборе штаммов, которые могут быть проанализированы в РТГА, необходимо вначале убедиться в наличии необходимого уровня гемагглютинирующего титра NA. При этом все штаммы тестируются в РГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата и без него.

В наших условиях в эпидемическом сезоне 2016–2017 гг. 31,4% выделенных на культуре клеток MDCK штаммов имели равный гемагглютинирующий титр в присутствии ингибитора NA и в его отсутствие. В эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. доля штаммов с такими же свойствами составила 55,4% (рис. 1). У 16 и 21% штаммов гемагглютинирующий титр падал в 2 раза (2016–2017 и 2017–2018 гг.). Таким образом, можно сделать вывод, что 68,6 и 44,6% исследованных штаммов за два эпидемических сезона имели NA, способную связываться

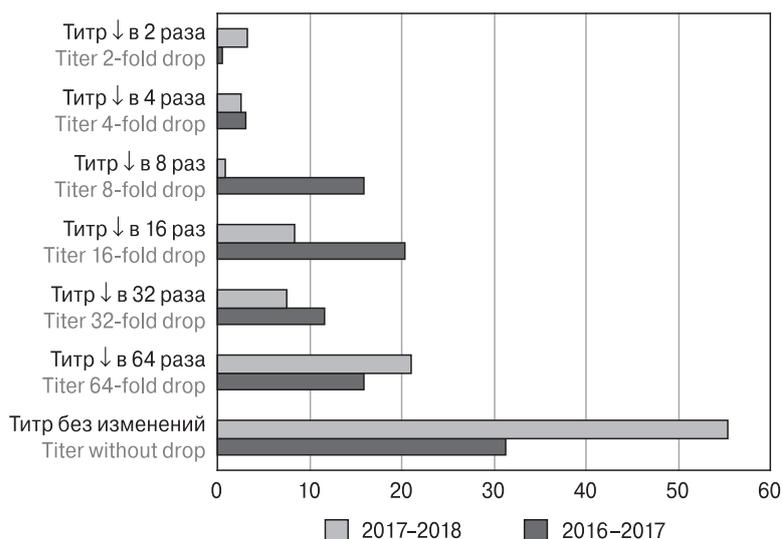


Рисунок 1. Изменения в гемагглютинирующих титрах вирусов гриппа, выделенных на клеточной культуре MDCK в 2016–2018 гг., в зависимости от присутствия в буфере ингибитора NA — озельтамивира карбоксилата

Figure 1. Changes in the hemagglutinating titers of influenza viruses isolated in MDCK in 2016–2018, depending on the presence in the buffer of the NA inhibitor — 20 nM oseltamivir carboxylate

Таблица. Сравнение антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1

Table. Comparison of antigenic properties of influenza A(H3N2) viruses isolated on MDCK and MDCK-Siat1 cell cultures

Вирусы гриппа Influenza A(H3N2) viruses	Система выделения Isolation system	Постинфекционные крысиные поликлональные антитысыворотки к вирусам гриппа А(Н3N2) Postinfectious rat polyclonal antisera					
		А/Гонконг/ 4801/2014 A/Hong Kong/ 4801/2014 MDCK 3С.2а	А/СПб/80/2014 A/St. Petersburg/ 80/2014 MDCK 3С.2а	А/Нидерланды/ 525/2014 A/Netherlands/ 525/2014 MDCK 3С.2b	А/Швейцария/ 9715293/2013 A/Switzerland/ 9715293/2013 Egg 3С.3а	А/Хабаровск/ 19/2015 A/Khabarovsk/ 19/2015 MDCK 3С.3а	А/Сингапур/ INFIMH-16-0019/16 A/Singapore/ INFIMH-16-0019/16 MDCK-Siat1 3С.2а1
А/Гонконг/4801/2014 A/Hong Kong/4801/2014	MDCK	160	160	80	40	40	320
А/Санкт-Петербург/80/2014 A/St. Petersburg/80/2014	MDCK	80	320	40	20	20	320
А/Нидерланды/525/2014 A/Netherlands/525/2014	MDCK	160	160	320	160	160	320
А/Швейцария/9715293/2013 A/Switzerland/9715293/2013	Egg*	40	40	20	640	320	80
А/Сингапур/INFIMH-16-0019/16 A/Singapore/INFIMH-16-0019/16	Egg	160	320	40	40	20	320
А/Санкт-Петербург/71/17 A/St. Petersburg/71/17	MDCK-Siat1	80	320	40	<	10	320
А/Санкт-Петербург/71/17 A/St. Petersburg/71/17	MDCK	40	160	40	10	10	320
А/Санкт-Петербург/80/17 A/St. Petersburg/80/17	MDCK-Siat1	40	80	20	<	<	160
А/Санкт-Петербург/80/17 A/St. Petersburg/80/17	MDCK	40	160	40	20	10	160
А/Санкт-Петербург/87/17 A/St. Petersburg/87/17	MDCK-Siat1	80	160	20	<	<	160
А/Санкт-Петербург/87/17 A/St. Petersburg/87/17	MDCK	80	160	20	10	10	320
А/Санкт-Петербург/89/17 A/St. Petersburg/89/18	MDCK-Siat1	40	40	10	<	<	160
А/Санкт-Петербург/89/17 A/St. Petersburg/89/18	MDCK	80	80	20	10	<	160
А/Санкт-Петербург/104/17 A/St. Petersburg/104/17	MDCK-Siat1	80	80	20	<	<	160
А/Санкт-Петербург/104/17 A/St. Petersburg/104/17	MDCK	80	80	20	10	10	320

Примечание. *Штаммы, выделенные на куриных эмбрионах.
Note. * Strains isolated in chicken embryos.

с рецепторами на поверхности эритроцитов человека. Штаммы, гемагглютинирующий титр которых уменьшается более чем в 4 раза, невозможно проанализировать в РТГА, что затрудняет анализ дрейфовых изменений подобных изолятов. Для вирусов гриппа, выделенных на культуре MDCK-Siat1, также наблюдается падение титров в присутствии озельтамивира карбоксилата (рис. 2). 29,6% изученных MDCK-Siat1-изолятов демонстрировали уменьшение гемагглютинирующего титра в 2 раза, тогда как среди MDCK-вирусов доля таких штаммов составила 18,1%. Вирусов, титр которых уменьшался в 16 раз, было существенно больше среди MDCK-Siat1-изолятов (18,5%). Таким образом, применение клеточной системы MDCK-Siat1 при выделении вирусов гриппа А(Н3N2) не дало однозначных результатов.

Вирусы гриппа, выделенные параллельно на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1 и имеющие ГА титры $\geq 1:8$, показали сходные результаты в РТГА (табл.). Можно заключить, что клеточные линии не оказывают влияния на антигенные свойства выделенных на них изолятов. Различия между результатами РТГА штаммов при взаимодействии с антисыворотками составляли не более $1/2$ титра, что находится в пределах погрешности используемого метода.

Антигенные и генетические свойства

Согласно филогенетическому анализу, среди многочисленных групп вирусов гриппа А(Н3N2) в настоящее время в мире широкое распространение получили штаммы, принадлежащие к клайду 3С.2а [20, 21]. По результатам

РТГА и микронейтрализации, большинство вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг., были антигенно подобны штамму, введенному в состав вакцин на предстоящий эпидемический сезон 2018–2019 гг. — А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016, и реагировали с антисывороткой, полученной к клеточному (MDCK-Siat1) варианту данного штамма до $1-1/2$ гомологичного титра. При этом большинство из проанализированных штаммов также были родственны референс-вирусу А/Гонконг/4801/2014 (MDCK-вариант). Антигенные свойства вирусов, выделенных из постмортальных материалов, не отличались от таковых для вирусов, выделенных из назальных мазков. Все изоляты слабо взаимодействовали с антисывороткой к эталонному штамму генетической группы 3С.3b А/Нидерланды/525/2014. Взаимодействие с антисыворотками, полученными к вирусам группы 3С.3а — А/Швейцария/9715293/2013 и А/Хабаровск/19/2015, изолятов последних двух эпидемических сезонов, было минимальным либо отсутствовало.

По результатам антигенного анализа можно сделать вывод, что антигенные свойства вирусов гриппа А(Н3N2) 2017–2018 гг. не отличаются от вирусов 2016–2017 гг. В настоящее время невозможно выявить антигенные различия вирусов группы 3С.2а и 3С.2а1. При этом по антигенным свойствам группы 3С.2а и 3С.3а сильно отличаются. Вирусы клайда 3С.3а на территории России встречались в эпидемическом сезоне 2014–2015 гг. Впоследствии представителей данной группы на территории РФ выделено и охарактеризовано не было.

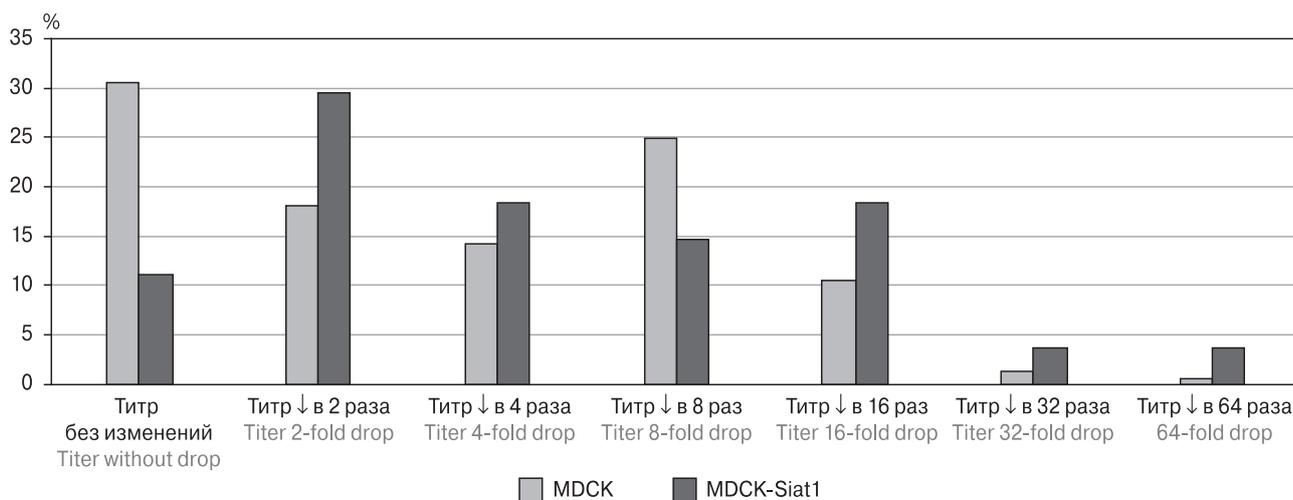


Рисунок 2. Изменения в гемагглютинирующих титрах вирусов гриппа, выделенных на клеточной культуре MDCK и MDCK-Siat1, в зависимости от присутствия в буфере ингибитора NA — 20 нМ озельтамивира карбоксилата

Figure 2. Changes in the hemagglutinating titers of influenza viruses isolated in MDCK and MDCK-Siat1 cell cultures, depending on the presence in the buffer of the NA inhibitor — 20 nM oseltamivir carboxylate

В настоящее время регистрируется появление новых генетических групп и подгрупп вирусов А(Н3N2), что демонстрирует нарастающую гетерогенность популяции вирусов гриппа данного подтипа [20, 21]. Во время эпидемического сезона 2017–2018 гг. на территории России циркулировали вирусы гриппа, принадлежащие к клайду 3С.2а. Генетическая группа 3С.2а обладает следующими характерными аминокислотными заменами: L3I, N144S (потеря потенциального сайта гликозилирования), F159Y, K160T, N225D и Q311H в субъединице HA1 [21]. В конце эпидемического сезона 2018 г. в России были выявлены вирусы, принадлежащие к разным генетическим подгруппам. Большинство секвенированных штаммов по гену HA принадлежало к новому субклайду 3С.2а2 и характеризовалось следующими аминокислотными заменами: T131K, R142K — в антигенном сайте А и R261Q [22].

По данным ВОЗ, антигенные характеристики вирусов, принадлежащих к субклайдам 3С.2а3, 3С.2а2, 3С.2а1b, имеют определенные отличия [19]. Такое разнообразие циркулирующих вирусов А(Н3N2) по антигенным и генетическим характеристикам является благоприятным фоном для появления вирусов с новыми свойствами.

Активность нейраминидазы современных российских изолятов

Для оценки активности вирусной нейраминидазы штаммов, выделенных на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1, использовалась стандартная флуоресцентная методика с субстратом MUNANA. Для получения более точных количественных показателей гемагглютинирующий титр всех тест-вирусов был приравнен к единому показателю 1:4 в РГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата. В результате установлено, что вирусы, выделенные на клетках MDCK-Siat1, в большинстве случаев имеют более высокую активность нейраминидазы, чем аналогичные им MDCK-варианты. Например, вирус А/Санкт-Петербург/28/17_{MDCK-Siat1} имеет активность NA равную 40,91 мкмоль 4-MU/мл × мин, а аналогичный штамм, выделенный на MDCK — 7,06 мкмоль 4-MU/мл × мин (рис. 3). Для выяснения причины значительно более высокой активности NA были проанализированы первичные АК последовательности данных штаммов. По результатам секвенирования в аминокислотных последовательностях NA соответствующих пар вирусов отличий выявлено не было. Исключение составил штамм

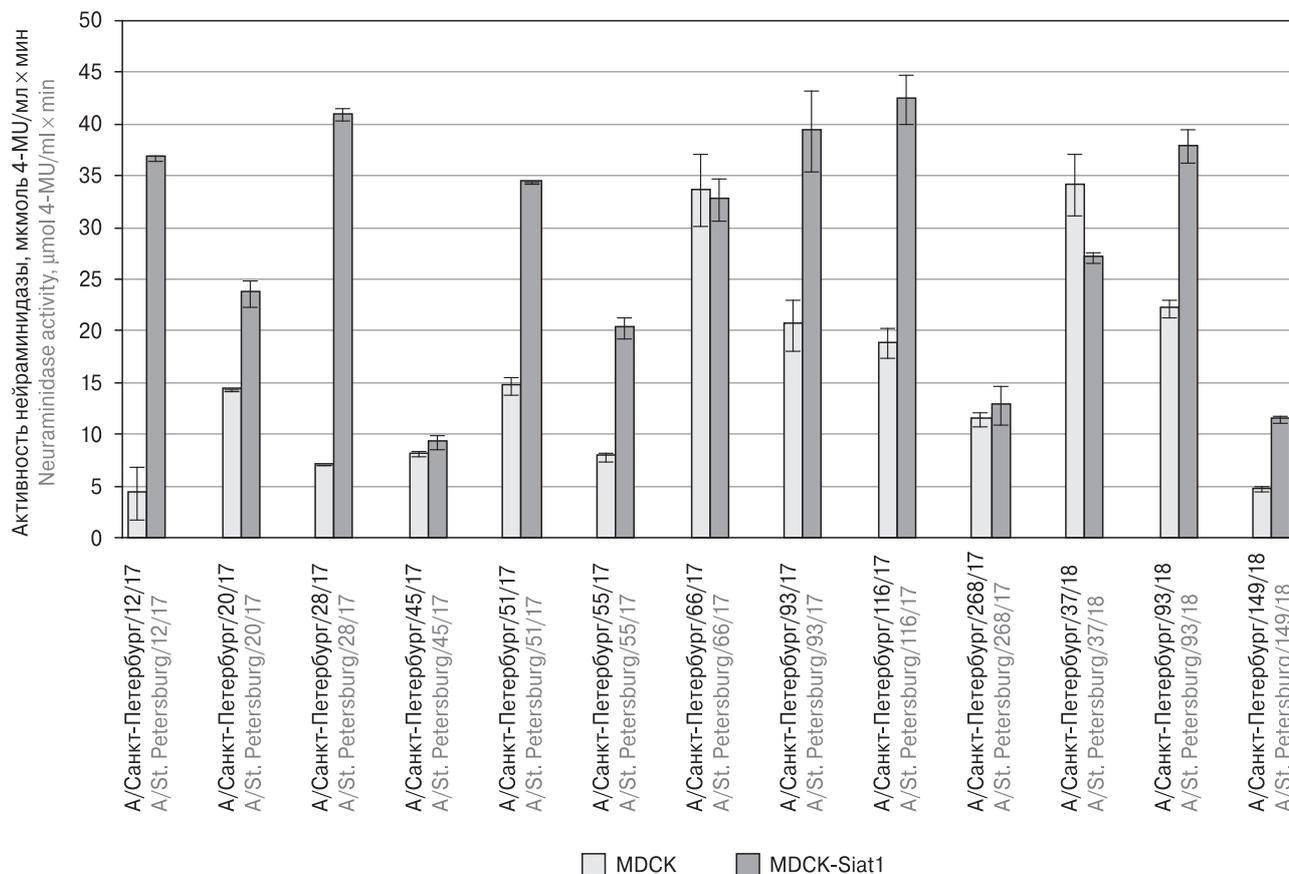


Рисунок 3. Активность нейраминидазы в тесте MUNANA вирусов гриппа А(Н3N2) 2016–2018 гг. выделения

Figure 3. Neuraminidase activity in the MUNANA test of influenza A(H3N2) viruses 2016–2018

А/Санкт-Петербург/45/2017. В аминокислотной последовательности нейраминидазы вируса А/Санкт-Петербург/45/17MDCK произошла замена относительно вируса, выращенного на MDCK-Siat1 — D151N. Однако по результатам MUNANA-теста активность MDCK и MDCK-Siat1-вариантов была примерно равна и составила 8,2–9,2 мкмоль 4-MU/мл × мин соответственно. Так как на поверхности клеток MDCK-Siat1 находится большее количество рецепторов типа $\alpha 2,6$ -SA, то вирусы с повышенной активностью NA обладают преимуществом при размножении. Более активная NA отщепляет большее количество рецепторов при высвобождении вирионов [10, 12]. Впрочем, не исключено, что при капиллярном секвенировании по Сэнгеру остаются не обнаруженными минорные мутантные варианты вируса с пониженной активностью NA, присутствующие в смешанной популяции, что особенно характерно для штаммов, полученных на линии MDCK [12].

Заключение

Постоянный высокий уровень антигенного дрейфа вирусов гриппа А(Н3N2) наряду с изменением рецепторных свойств этих вирусов и приобретением ряда адаптационных замен в поверхностных белках диктует необходимость подбора оптимальных условий для выделения и антигенной характеристики циркулирующих штаммов. В данной работе подтверждена роль

нейраминидазы как интерферирующего фактора при оценке гемагглютинирующих титров современных штаммов и необходимость блокирования ее активности озельтамивиром карбоксилатом для получения неискаженных результатов в антигенном анализе вирусов гриппа. В то же время сравнительный антигенный анализ актуальных штаммов А(Н3N2) методами реакции торможения гемагглютинации и микронейтрализации показал одинаковые результаты. В настоящее время продолжают работы по выявлению наиболее перmissive клеточной культуры для выделения вирусов данного подтипа, которая не будет оказывать влияния на антигенные и генетические свойства изолятов [14]. Наше исследование показывает, что выделение на культурах MDCK или MDCK-Siat1 не влияет на антигенные свойства современных вирусов гриппа А(Н3N2) человека. В то же время система выделения может приводить к возникновению адаптационных замен в нейраминидазе выделенных вирусов, что согласуется с данными зарубежных исследователей [6].

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам базовых вирусологических лабораторий ФБУЗ за присланные изоляты, а также доктору J. McCauley (СЦ по гриппу ВОЗ, Лондон, Великобритания) за предоставление хорьковых антисывороток.

Список литературы/References

1. Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Прокопец А.В., Бильданова Е.Р., Еропкин М.Ю., Соминина А.А. Возможности использования поликлональных крысиных антисывороток в антигенном анализе вирусов гриппа человека // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. № 1 (68). С. 73–79. [Danilenko D.M., Konovalova N.I., Prokopets A.V., Bildanova E.R., Eroptkin M.Y., Somnina A.A. Potential use of rat polyclonal antisera for antigenic analysis of human influenza viruses. *Epidemiologija i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2013, vol. 68, no. 1, pp. 73–79. (In Russ.)]
2. Australian Influenza Surveillance Report and Activity Updates – 2017.
3. CDC: Influenza Activity in the United States During the 2017–18 Season and Composition of the 2018–19 Influenza Vaccine.
4. Gulati S., Smith D.F., Cummings R.D., Couch R.B., Griesemer S.B., George K.S., Webster R.G., Air G.M. Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying reference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread. *PLoS One*, 2013, vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0066325
5. Koel B.F., Burke D.F., Bestebroer T.M., van der Vliet S., Zondag G.C., Vervaeke G., Skepner E., Lewis N.S., Spronken M.I., Russell C.A., Eroptkin M.Y., Hurt A.C., Barr I.G., de Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Smith D.J. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science*, 2013, vol. 342, pp. 976–979. doi: 10.1126/science.1244730
6. Lin Y., Gregory V., Collins P., Kloess J., Wharton S., Cattle N., Lackenby A., Daniels R., Hay A. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A (H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 13, pp. 6769–6781. doi: 10.1128/JVI.00458-10
7. Lin Y., Wharton S.A., Whittaker L., Dai M., Ermetal B., Lo J., Pontoriero A., Baumeister E., Daniels R.S., McCauley J.W. The characteristics and antigenic properties of recently emerged subclade 3C.3a and 3C.2a human influenza A(H3N2) viruses passaged in MDCK cells. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2017, vol. 11, no. 3, pp. 263–274. doi: 10.1111/irv.12447
8. Lin Y., Xiong X., Wharton S.A., Martin S.R., Coombs P.J. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 52, pp. 21474–21479. doi: 10.1073/pnas.1218841110
9. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. *WHO Press*, 2011.
10. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N.A., Klenk H. Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 15, pp. 8418–8425. doi: 10.1128/JVI.77.15.8418-8425.2003

11. Mohr P.G., Deng Y.M., McKimm-Breschkin J.L. The neuraminidases of MDCK grown human influenza A(H3N2) viruses isolated since 1994 can demonstrate receptor binding. *Virology J.*, 2015, no. 12: 67. doi: 10.1186/s12985-015-0295-3
12. Namura D, Nguyen H.T., Sleeman K., Levine M., Mishin V.P., Yang H., Guo Z., Okomo-Adhiambo M., Xu X., Stevens J., Gubareva L.V. Cell culture-selected substitutions in influenza A(H3N2) neuraminidase affect drug susceptibility assessment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 12, pp. 6141–6146. doi: 10.1128/AAC.01364-13
13. Nicholls J.M., Bourne A.J., Chen H., Guan Y., Peiris J.S. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir. Res.*, 2007, vol. 8: 73. doi: 10.1186/1465-9921-8-73
14. Skowronski D.M., Sabaiduc S., Chambers C., Eshaghi A., Gubbay J.B. Kraiden M., Drews S.J., Martineau C., De Serres G., Dickinson J.A., Winter A.L., Bastien N., Li Y. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterization of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Eurosurveillance*, 2016, vol. 21, no. 3: 30112. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.3.30112
15. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, vol. 305, pp. 371–376. doi:10.1126/science.1097211
16. Xiong X., McCauley J.W., Steinhauer D.A. Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2014, vol. 385, pp. 63–91. doi: 10.1007/82_2014_423
17. Xue K.S., Greninger A.L., Pérez-Osorio A., Bloom J.D. Cooperating H3N2 influenza virus variants are not detectable in primary clinical samples. *mSphere*, 2018, vol. 3, no. 1: e00552-17. doi: 10.1128/mSphereDirect.00552-17
18. Xue K.S., Hooper K.A., Ollodart A.R., Dings A.S., Bloom J.D. Cooperation between distinct viral variants promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, no. 5: e13974. doi: 10.7554/eLife.13974
19. WHO Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season.
20. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza Annual report. *The Francis Crick Institute. February, 2017.*
21. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza Annual report. *The Francis Crick Institute. February, 2018.*
22. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza Annual report. *The Francis Crick Institute. September, 2018.*

Авторы:

Петрова П.А., младший научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Коновалова Н.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Васильева А.Д., лаборант-исследователь лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Еропкина Е.М., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Иванова А.А., м.н.с., лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Комиссаров А.Б., зав. лабораторией молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Еропкин М.Ю., д.б.н., зав. лабораторией эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Даниленко Д.М., к.б.н., зам. директора по научной работе, зав. отделом этиологии и эпидемиологии гриппа и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Petrova P.A., Junior Researcher, Department of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Konovalova N.I., PhD, Leading Researcher Assistant of the Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Vassilieva A.D., Research Assistant of the Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Eropkina E.M., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Ivanova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Komissarov A.B., Head of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Eropkin M.Yu., PhD, Head of the Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Danilenko D.M., PhD, Deputy Director on Science, Head of Etiology and Epidemiology of Influenza and ARI Department, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 14.03.2019

Received 31.10.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 14.03.2019

ISOLATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *PARATUBERCULOSIS* FROM MOUFLON IN BULGARIA

T. Savova^a, R. Petrova^a, V. Valcheva^b, M. Bonovska^b, H. Najdenski^b

^a National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

^b The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Abstract. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent of paratuberculosis (John's disease) mainly in large and small domestic and wild ruminants, and suspected causative agent in human Crohn's disease. In Bulgaria, paratuberculosis is still poorly researched in both groups of ruminants. We present results of the first in-depth study of mouflon, grown free in one hunting reserve in the Western region of the country. The aim was to prove the presence of MAP in diagnostic materials from regularly hunted or dead mouflon suspected for paratuberculosis. Small intestine and mesenteric lymph nodes (MLN) from 12 hunted and 4 dead mouflon and 10 faecal samples (Fc) were studied in the period of 2009–2013. Typical for paratuberculosis pathomorphological lesions were observed in four mouflon (of 16 examined). The intestinal wall was thickened, strongly folded and soft, with severe hyperemia. The MLN were enlarged, soft, with marbled appearance. The affected section of the ileum showed hyperplasia of the mucous corion and submucosa with diffuse infiltration of epithelioid cells. Lymphadenopathy with atrophy of T and B lymphocytes areas was observed in the mesenteric lymph nodes. For bacteriological isolation of MAP, the tissue and faecal samples were decontaminated with NALC-NaOH, cultured in Middlebrook 7H9 Broth and on Herrold's medium. The Ziehl–Neelsen stained smears and isolates were examined microscopically for acid-fast bacteria. Presence of MAP was observed in tissue samples of 4 (25%) mouflon and in 2 (20%) faecal samples. The same samples were confirmed by the IS900 PCR for the presence of specific for MAP fragments with a commercial amplification kit. The cases of paratuberculosis found at different times in the free-living mouflon in our study prove that the disease exists in Bulgaria and highlight the need for more serious control of the disease among wild and domestic ruminants.

Key words: mouflon, paratuberculosis, pathomorphology, microbiology, PCR.

ВЫДЕЛЕНИЕ *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *PARATUBERCULOSIS* ИЗ МУФЛОНА В БОЛГАРИИ

Савова Т.¹, Петрова Р.¹, Вылчева В.², Боновска М.², Найденски Х.²

¹ Национальный диагностический и научно-исследовательский ветеринарный медицинский институт, София, Болгария

² Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, Болгарская академия наук, София, Болгария

Резюме. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) является этиологическим агентом паратуберкулеза (болезнь Джона), главным образом, у крупных и мелких домашних и диких жвачных животных и предполагаемым возбудителем болезни Крона у человека. В Болгарии паратуберкулез все еще плохо

Адрес для переписки:

Магдалена Боновска
26, ул. Акад. Георги Бончев, София 1113, Болгария, Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, Болгарская академия наук.
Тел.: +3592 979-31-57. E-mail: m_bonovska@abv.bg
Виолета Вылчева
26, ул. Акад. Георги Бончев, София 1113, Болгария, Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, Болгарская академия наук.
Тел.: +3592 979-31-57. E-mail: violeta_valcheva@mail.bg

Contacts:

Magdalena Bonovska
26, Acad. Georgi Bonchev str., Sofia 1113, Bulgaria, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences.
Phone: +3592 979-31-57. E-mail: m_bonovska@abv.bg
Violeta Valcheva
26, Acad. Georgi Bonchev str., Sofia 1113, Bulgaria, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences.
Phone: +3592 979-31-57. E-mail: violeta_valcheva@mail.bg

Библиографическое описание:

Савова Т., Петрова Р., Вылчева В., Боновска М., Найденски Х. Выделение *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* из муфлона в Болгарии // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 665–670. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-665-670

Citation:

Savova T., Petrova R., Valcheva V., Bonovska M., Najdenski H. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from mouflon in Bulgaria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 665–670. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-665-670

изучен в обеих группах жвачных животных. В данной работе представлены результаты первого углубленного исследования муфлонов, выращенных в охотничьем заповеднике в западном регионе страны. Целью исследования было доказать наличие MAP в диагностическом материале от муфлонов при подозрении на паратуберкулез. В период 2009–2013 гг. были исследованы образцы из тонкого кишечника и мезентериальных лимфатических узлов (МЛУ) 12 убитых во время охоты и 4 павших муфлонов и 10 образцов фекалий. Типичные патоморфологические поражения, характерные для паратуберкулеза, наблюдались у четырех муфлонов (из 16 обследованных). Стенка кишечника была толстой, сильно скрученной и мягкой, с выраженной гиперемией. МЛУ были увеличенными, мягкими, имели мраморный внешний вид. На пораженном участке подвздошной кишки наблюдались гиперплазия слизистой оболочки и диффузная инфильтрация эпителиоидными клетками подслизистой оболочки. В мезентериальных лимфатических узлах наблюдалась лимфаденопатия с атрофией в области Т- и В-лимфоцитов. Для бактериологического выделения MAP образцы тканей и фекалий дезактивировали NALC-NaOH, культивировали в бульоне Миддлбрук 7Н9 и на плотной среде Херролда. Мазки, окрашенные по Цилю–Нильсену, и изоляты, исследовали под микроскопом на наличие кислотоустойчивых бактерий. Присутствие MAP наблюдалось в образцах ткани 4 (25%) муфлона и в 2 (20%) образцах фекалий. Присутствие MAP в тех же самых образцах было подтверждено с помощью ПЦР IS900 с коммерческим набором для амплификации специфического для MAP фрагмента. Случаи паратуберкулеза, обнаруженные в нашем исследовании в разное время у свободно живущих муфлонов, показывают, что MAP циркулирует в Болгарии и подчеркивают необходимость более строгого контроля заболеваемости паратуберкулезом среди диких и домашних жвачных животных.

Ключевые слова: муфлон, паратуберкулез, патоморфология, микробиология, ПЦР.

Introduction

Paratuberculosis is one of the oldest diseases in animals, described in 1829 in England and studied by John and Froitam in 1895. They first detected acid-alcohol-resistant bacillus in the intestine of a cow with chronic diarrhea. Twort and Ingram (1912) obtained a pure bacterial culture and gave a general description of the disease, named “John’s disease” [8]. At the suggestion of Thorel, the etiological agent was named *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) [24].

The isolation of MAP from the blood culture of patients, from breast milk and patients with ulcerative colitis gives reason to accept MAP as one of the etiological factors in Crohn’s disease [6, 15, 16, 17]. This shows zoonotic nature of MAP, although the question still remains controversial [18, 21].

Etiological agent of the disease, *M. paratuberculosis* is small, thin, Gram-positive, acid-resistant rod. The bacteria are immobile, do not form spores and capsules, pink stained by Ziehl–Neelsen. MAP grows on an enriched culture media and is very resistant to drying, low temperatures and disinfectants [22, 24, 26]. MAP is a facultative aerobic bacterium belonging to *Mycobacterium avium* complex [3, 8, 17, 24]. It is an obligate intracellular pathogen that can not replicate outside of animal and human hosts [2, 16, 18]. Characteristics distinguishing MAP from other *Mycobacterium* species, include its extremely slow growth, its inability to produce the necessary for its growth mycobactin and pos-

session of 14–18 copies of the IS900 insertion element in the MAP genome [4, 5, 20, 22].

Paratuberculosis (John’s disease) affects mainly the young domestic and wild ruminants, including mouflon (*Ovis aries musimon*; wild sheep), most commonly causing hypertrophic enteritis. Diagnosis of John’s disease is a difficult and very long process. In wildlife, paratuberculosis usually occurs subclinically without visible symptoms. The affected animals spread the agent in the environment through faeces and so contaminate soil, pastures and water and may be the source of infection for other animals [2, 10, 11, 18, 20].

The paratuberculosis in wild animals was first described in 1922 by Jarmy in an antelope in a zoo, and in 1949 by Dorofeev and Kalacheva in deer populations [3]. The disease in captive and free-range mouflon and other wildlife is described in many countries in Europe and worldwide. According to OIE (World Organisation for Animal Health) documents over the last decades, 44% of member states have reported the presence of paratuberculosis and in 2004 is categorized in sheet B as a disease with serious economic and health consequences [18].

In Bulgaria paratuberculosis in wild animals has been poorly studied. There are no official data on the prevalence of the disease in both domestic and wild ruminants. Because its rare clinical manifestations, the incidence of subclinical forms of the disease is not investigated or monitored. Only single cases in cattle of private farms were described [12]. In the period 2009–2013 was con-

ducted the first in-depth study of diagnostic materials from the hunted and dead wildlife, grown freely in one hunting area in the northwestern region of the country [22].

The aim of this study is to prove the presence of MAP in diagnostic material from legally hunted or dead mouflon suspected for paratuberculosis, which may be a risk for spreading the disease in the population of other wild and domestic ruminants in contact with infected animals or contaminated environment.

Materials and methods

Collection of samples. Samples from proximal and distal parts of the ileum (IL) and mesenteric lymph nodes (MLN) of 12 regularly hunted and 4 found dead mouflon were studied for visible macroscopic lesions of paratuberculosis. Faecal samples (Fc) from 8 of killed and 2 dead animals were collected and examined too.

Histopathologic examination. The examined tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin and processed routinely for histopathologic examination [12]. Sections (5 µm thick) were stained with Hematoxylin-Eosin (H&E).

Bacterial cultures. The isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from tissue samples (TS) and faeces (Fc) was carried out with commercial kit DNA-Sorb-B (Sacace Biotechnologies, Italy). The tissue smears stained with commercial Ziehl–Neelsen (ZN) Color Kit (Liofilchem, Italy) were observed microscopically. Briefly, the tissue and faecal samples were homogenised in saline solution and decontaminated with NALC-NaOH (N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide). The sediment obtained after the sample treatment was resuspended in phosphate buffer. 100 µl of each sample were cultured in 2 tubes with Herrold's medium with Mycobactin J and pyovate (Remel-Kansas, USA) and Middlebrook 7H9 Broth with polysorbate 80 (Becton&Dickinson, USA). Bacteriological study was conducted on 16 samples of IL, 10 of MLN and 10 of Fc. The samples were grown at 37°C from 3 to 6 months.

PCR detection assay. For isolation and amplification of MAP's DNA from tissue samples and faeces, both DNA-Sorb-B kit and respectively *M. paratuberculosis* Vet DNA amplification kit (Sacace Biotechnologies, Italy) were used. To confirm the strains identified bacteriologically as MAP, the IS900 PCR-based technique was carried out. DNA kit's control and DNA from MAP 7072 (clinical isolate from deer) were used as positive controls. The size of the PCR products was determined by a DNA marker of 100 bp.

Results

Typical for paratuberculosis pathomorphological lesions were observed in 25% of mouflon (4 out of 16 examined). In affected animals, hyperplastic changes were observed in the proximal and distal segments of the ileum. The intestinal wall was thickened, strongly folded and soft, with severe hyperemia (fig. 1, see cover II). Intestinal content was scanty with watery to thick whitish consistency (fig. 2, cover II). The MLN were enlarged, soft, with marbled appearance. Their capsule and cut surface had an intensive yellowish-cream color, without bleeding, abscesses or caseous foci.

Histologically the affected section of the ileum showed hyperplasia of the mucous corion and submucosa with diffuse infiltration of epithelioid cells. In the altered parts of the ileum diffuse noncaseating granulomatous enteritis was observed. The normal structure of the intestinal mucosa was altered. The lamina propria was markedly expanded by lymphocytes and scattered macrophages with foamy cytoplasm and absence of Langhans giant cells. Intestinal villi were shortened and thickened. Atrophy of the intestinal crypts was observed due to compression from the mononuclear inflammatory cells. The microscopic examination of lymph nodes from mouflon revealed extracellular deposition of amyloid in the form of an amorphous eosinophilic substance. Its accumulation is high and exerts strong pressure on the lymph tissue, causing severe atrophy of T and B lymphocyte areas. The lymph node cortical and para-cortical zones are mainly affected (fig. 3, cover II).

The bacteriological study of MLN and IL tissue samples and faeces showed primary growth of single colonies at 5–6 weeks of the culturing on the selective Herold's medium. In the presence of specific growth we observed clearly separated, very small, convex, soft, colorless, translucent and humid colonies. In abundant growth colonies remained small, round, smooth and glossy (fig. 4, cover II). On the third month of culturing on the solid medium the colonies became opaque, gray-whitish, rough and dry. On the Middlebrook 7H9 Broth bacteria have formed a thick, whitish veil. MAP was isolated from tissue samples of the ileum and MLN of 3 hunted and 1 dead mouflon with pathomorphological lesions and from 2 faecal samples. Other tissue samples and faeces, showed no growth on culture media and after 6 months cultivation (tabl.). The microscopic observation of Ziehl–Neelsen (ZN) colored smears found immobile, short pink-red colored rods, clustered on heaps or located severally (fig. 5, cover II). The presence of MAP in the same samples was confirmed by IS900 PCR kit. PCR analysis showed a presence of specific 209-bp DNA fragment (fig. 6). The other samples were PCR negative (tabl.).

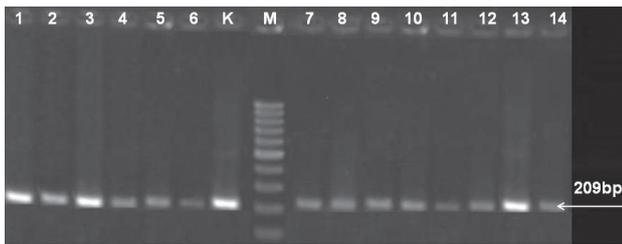


Figure 6. 209 bp-PCR products from bacterial isolates and tissue samples from the mesenteric lymph nodes (MLN) and small intestines (SI) of mouflons

1–3 — bacterial isolates from MLN; 4–6 — bacterial isolates from the small intestine; K — positiv control MAP 7072 (clinical isolate from deer); M — molecular weight marker; 7–8 — faecal samples; 9–11 — tissue specimens of MLN; 12, 14 — tissue samples of the intestine; 13 — DNA kit's control

Discussion

In wildlife disease usually remains hidden and animals are only carriers and emitters of mycobacteria, which hinders the diagnosis of paratuberculosis. In the examined samples pathoanatomical changes were observed in the small intestine and mesenteric lymph nodes. Proliferation of intestinal mucosa varied significantly from less pronounced to clearly visible changes. Similar lesions in domestic and wild ruminants with paratuberculosis were described by many authors [3, 7, 8, 9, 12, 14, 20, 26].

The histological examination is the first opportunity for detection of subclinical cases of the disease and in wild animals it is very important. In the altered parts of the intestinal mucosa we observed infiltration of a variable numbers of diffusely located macrophages, lymphocytes and plasma cells significantly expanding lamina propria, thickened

intestinal villi and necrotic debris in intestinal crypts. In the MLNs we observed lymphadenopathy. Many authors reported similar histological findings in sheep, goats, cattle and wild animals suffering from paratuberculosis [2, 7, 12, 14, 26]. In the affected tissues, some of authors observed also the presence of a single or large amount of multinucleated Langhans giant cells. We have not found giant cells, but only diffuse deposition of an amorphous, eosinophilic extracellular substance and atrophy of the T and B lymphocyte areas. Such results are not unusual and depend on the species and age of the animals, the development stage and intensity of the infection as well as the prevalence of MAP in the wildlife.

After microscopic examination of tissue and faecal smears we observed pink-red rods located singly or clustered on heaps, resembling morphology many other mycobacteria. Therefore, the finds can only direct us to the disease. The bacteriological method, although time consuming, still remains a “gold standard” for detection of MAP because it does not give false-positive results [11, 18, 19]. Unlike other mycobacteria, MAP is best developed for the nutrient medium containing mycobactin J, a growth factor that bacteria can't produce on their own [1, 3, 18, 26]. Such is the Herald's medium, which we have also successfully used. The infectious agent was isolated from the altered tissues of the IL and MLN of 4 (25%) mouflons. The isolation of MAP from faecal samples is also an important moment in the diagnosis of the disease. Although the method is considered to be highly specific and sensitive test to detect infected animals in herds [11], it has limited sensitivity for subclinically infected and free-living wild animals. In our study MAP was isolated from only two faecal samples (20%). Established bacteriological findings corresponded to those described by other

Table. Overview of data obtained from mouflon's samples and types of analyses

Animal species	Tested animals	MAP positive animals (No.)	Type of sample	Analyzed samples	Type of analysis				PCR (IS900) (+)
					Autopsy findings (+)	Histology findings (+)	Microscopy (+)	Culture (+)	
Mouflons	hunted 12	3	SI	12	3	3	3	3	3
			MLN	10	3	3	3	3	3
			Fc	8			2	2	2
	dead 4	1	SI	4	1	1	1	1	1
			MLN	4	1	1	1	1	1
			Fc	2			0	0	0
Total No.	16	4	Ts/Fc	30/ 10	8	8	10	10	10

SI — small intestine; MLN — mesenteric lymph nodes; Fc — faeces; Ts — tissue samples (SI + MLN).

authors [2, 20, 23]. The MAP isolation from tissues and faeces of mouflon was confirmed by the PCR which is recommended by the World Organisation for Animal Health [18]. Based on genomic analysis Englund et al. [5] reveal that this element is also present in other mycobacterial species. Harris and Barletta [8], Vansnick et al. [25] noted that most of the used IS900 PCR primers did not differentiate MAP from other members of the *M. avium* complex because they give identical DNA amplicons. More recent research by other authors describe different variants for detection of paratuberculosis bacteria and most of them are also based on the IS900 insertion element, which is accepted as a standard molecular marker for MAP [5, 20, 23, 26].

We used an IS900 amplification kit, recommended as a specific for *M. avium* complex, respectively for MAP [22]. The resulting PCR products coincided with the established specific patomorphological changes and the isolated bacterial culture from the affected tissues of the four mouflons and the two faecal samples, indicating that the amplicons were MAP-specific (tabl.).

The paratuberculosis refers to an “open infection” with large excretion of causative agent in the environment. Contamination of soils, plants, pastures, water and air after excretion of MAP with

faeces of naturally infected mouflon was previously reported [10, 19, 26]. The causative agent was isolated from both faeces and skeletal muscles of the tested mouflon [23]. The excretion of MAP into the environment presents a risk of transmission of the disease to other wild and domestic animals and to endanger the people consuming contaminated food and water. This confirms the serious health and economic importance of the disease [16, 18].

The paratuberculosis cases detected over different periods in free-living mouflon in our study shown that the disease exists in Bulgaria. The results indicate the need for further research on hunting reserves in the country and their neighboring cattle farms. This would clarify the prevalence of the disease among wildlife and the potential risk for the domestic ruminants.

Acknowledgements

The authors thank the Veterinary Research Institute Brno, Czech Republic for providing MAP isolate 7072 from deer. We are grateful to Dr. Aneta Trifonova and Dr. Ivan Todev from the National Research Station of Game Management, Biology and Pathology, Sofia, Bulgaria for providing the diagnostic materials from mouflons.

References

1. Ayele W.Y., Svastova P., Roubal P., Bartos M., Pavlik I. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurised cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 2, pp. 1210–1214.
2. Behr M.A., Collins D.M. Paratuberculosis: organism, disease, control. *CAB International, Oxford U.K.*, 2010, 392 p.
3. Belchev D. Investigations on paratuberculosis on the cattle and sheep. PhD Thesis. Central Research Veterinary Medical Institute. *Bulgaria: Sofia*, 1977.
4. Collins D.M., Gabric D.M., de Lisle G.W. Identification of a repetitive DNA sequence specific to Mycobacterium paratuberculosis. *FEMS Microbiol.*, 1989, vol. 60, pp. 175–178.
5. Englund S., Bölske G., Johansson K.E. An IS900 like sequence found in a Mycobacterium species other than Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *FEMS Microbiol.*, 2002, vol. 209, pp. 267–271.
6. Golan L., Livneh-Kol A., Gonen E., Yagel S., Rosenshine I., Shpigel N.Y. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis invades human small-intestinal goblet cells and elicits inflammation. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 199, no. 3, pp. 350–354.
7. Hailat N.Q., Hananeh W., Metekia A.S., Stabel J.R., A-Majali A., Lafi S. Pathology of subclinical paratuberculosis (Johne's Disease) in Awassi sheep with reference to its occurrence in Jordan. *Veterinarni Medicina*, 2010, vol. 55, no. 12, pp. 590–602.
8. Harris N.B., Barletta R.G. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *J. Dairy Sci.*, 1998, vol. 81, no. 1, pp. 283–288.
9. Johne H.A., Frothingham L. Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Pathologie*, 1895, vol. 21, pp. 438–454.
10. Kaevska M., Lvoncik S., Lamka J., Pavlik I., Slana I. Spread of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Through Soil and Grass on a Mouflon (*Ovis aries*) Pasture. *Curr. Microbiol.*, 2014, vol. 69, pp. 495–500.
11. Kalis C.H.J., Collins, M.T., Barkema, H.W., Hesselink, J.W. Certification of herds as free of Mycobacterium paratuberculosis infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev. Vet. Med.*, 2004, vol. 65, pp. 189–204.
12. Koev K., Dinev I., Atev I. Cases of paratuberculosis in cattle. *Veterinarna Sbirka*, 2015, no. 1–2, pp. 34–37.
13. Lillie R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd edition. New York: McGraw-Hill, 1965.
14. Manning E.J.B. Paratuberculosis in captive and free-ranging wildlife. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2011, vol. 27, no. 3, pp. 621–630.
15. McNees A.L., Markesich D., Zayyani N.R., Graham D.Y. Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015, vol. 9, no. 12, pp. 1523–1534.
16. Naser S.A., Ghobrial G., Romero C., Valentine J.F. Culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*, 2004, vol. 364, pp. 1039–1044.
17. Naser S.A., Schwartz D., Shafran I. Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.*, 2000, vol. 95, pp. 1094–1095.

18. OIE (World Organisation for Animal Health), Terrestrial Manual, 2014. Chapter 2.1.11. Paratuberculosis (Johne's disease).
19. Pribylova R., Slana I., Kaevska M., Lamka J., Babak V., Jandak J., Pavlik I. Soil and plant contamination with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis after exposure to naturally contaminated mouflon feces. *Curr. Microbiol.*, 2011, vol. 62, pp. 1405–1410.
20. Pribylova R., Slana I., Lamka J., Babak V., Hruska K., Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a mouflon herd without clinical symptoms monitored using IS900 real-time PCR: a case report. *Veterinarni Medicina*, 2010, vol. 55, no. 12, pp. 625–630.
21. Sartor R.B. Does *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut*, 2005, vol. 54, no. 7, pp. 896–898.
22. Savova T. New methods for diagnostics of infections caused by *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. PhD thesis. *Bulgaria: Sofia*, 2014.
23. Slaná I., Lamka J., Příbylová-Dziedzinská R. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in mouflon muscle tissue. *MASO Int. J. Food Sci. Technol.*, 2014, vol. 2, pp. 107–111.
24. Thorel M.F., Krichevsky M., Lévy-Frébault V.V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. silvaticum subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990, vol. 40, no. 3, pp. 254–260.
25. Vansnick E., de Rijk P., Vercammen F., Geysen D., Rigouts L., Portaels F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 2004, vol. 3, no. 100, pp. 197–204.
26. Zarei Kordshouli F., Khodakaram Tafti A., Haghkhah M. Pathological, bacteriological, and molecular characteristics of natural outbreaks of Johne's disease in goats of Fars Province, Iran. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2016, vol. 5, no 1, p. 202.

Авторы:

Савова Т., доцент, к.в.м.н., зав. Национальной референс-лабораторией по туберкулезу животных в Национальном диагностическом научно-исследовательском ветеринарном медицинском институте «Проф. Д-р Г. Павлов», София, Болгария;

Петрова Р., главный ассистент, к.в.м.н., зав. Национальной референс-лабораторией по сибирской язве и бешенству у животных, кафедра патоморфологии Национального диагностического научно-исследовательского ветеринарного медицинского института «Проф. Д-р Г. Павлов», София, Болгария;

Вылчева В., главный ассистент, к.б.н., Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, отдел инфекционной микробиологии, лаборатория зоонозов и бактериальной вирулентности, Болгарская академия наук, София, Болгария;

Боновска М., профессор, к.в.м.н., Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, отдел инфекционной микробиологии и лабораторией зоонозов и бактериальной вирулентности, Болгарская академия наук, София, Болгария;

Найденски Х., член-корреспондент, профессор, д.в.м.н., директор Института микробиологии им. Стефана Ангелова, зав. отделом инфекционной микробиологии и лабораторией зоонозов и бактериальной вирулентности, Болгарская академия наук, София, Болгария.

Authors:

Savova T., Associate Professor, PhD (Veterinary Medicine), Head of National Reference Laboratory for Animal Tuberculosis at the National Diagnostic Research Veterinary Medical Institute "Prof. Dr. G. Pavlov", Sofia, Bulgaria;

Petrova R., Assistant Professor, PhD (Veterinary Medicine), Head of the National Reference Laboratory for Anthrax and Rabies in Animals, Department of Pathomorphology at the National Diagnostic Research Veterinary Medical Institute "Prof. Dr. G. Pavlov", Sofia, Bulgaria;

Valcheva V., Assistant Professor, PhD (Biology), The Stephan Angeloff Institute of Microbiology at the Bulgarian Academy of Sciences, Department of Infectious Microbiology, Laboratory of Zoonosis and Bacterial Virulence, Sofia, Bulgaria;

Bonovska M., Professor, PhD (Veterinary Medicine), The Stephan Angeloff Institute of Microbiology at the Bulgarian Academy of Sciences, Department of Infectious Microbiology, Laboratory of Zoonosis and Bacterial Virulence, Sofia, Bulgaria;

Najdenski H., Corresponding Member, Professor, DS (Veterinary Medicine), Director of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology at the Bulgarian Academy of Sciences, Head of Department of Infectious Microbiology and Laboratory of Zoonosis and Bacterial Virulence, Sofia, Bulgaria.

Поступила в редакцию 11.02.2019
Отправлена на доработку 05.03.2019
Принята к печати 26.03.2019

Received 11.02.2019
Revision received 05.03.2019
Accepted 26.03.2019

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* — ПРОДУЦЕНТОВ КАРБАПЕНЕМАЗ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ БЕЛАРУСИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ, ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

Д.В. Тапальский¹, О.И. Савченко², Н.А. Бонда³

¹ УО Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

² Гомельская областная клиническая больница, г. Гомель, Беларусь

³ ГУ Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Гомель, Беларусь

Резюме. Охарактеризована распространенность карбапенемаза-продуцирующих *Klebsiella pneumoniae* в организациях здравоохранения, определена их чувствительность к антимикробным препаратам (АМП), комбинациям антимикробных препаратов, дезинфектантам. В рамках программы микробиологического мониторинга отобрано 58 клинических изолятов *K. pneumoniae*, нечувствительных к карбапенемам и/или полимиксинам. Гены, кодирующие карбапенемазы групп KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM, выявлялись методом мультиплексной ПЦР в реальном времени. Чувствительность к антимикробным препаратам определялась автоматизированным методом на микробиологическом анализаторе «VITEK-2 Compact» (bioMérieux, Франция) и методом последовательных микроразведений в бульоне. Определение чувствительности к 11 двойным комбинациям антимикробных препаратов выполнено модифицированным методом тестирования бактерицидности различных комбинаций. В составе комбинаций тестировали АМП, взятые в пороговых фармакокинетических/фармакодинамических (ФК/ФД) концентрациях: меропенем — 8 мкг/мл, амикацин — 16 мкг/мл, левофлоксацин — 1 мкг/мл, тигециклин — 0,5 мкг/мл, фосфомицин — 32 мкг/мл, колистин — 2 мкг/мл. Чувствительность к 7 комбинированным дезинфицирующим средствам различного состава определена суспензионным методом. Присутствие генов карбапенемаз выявлено у 22 клинических изолятов *K. pneumoniae*. Из них 19 изолятов содержали ген *bla*_{OXA-48}, и 3 изолята — ген *bla*_{NDM}. Продуценты карбапенемаз выявлены в 10 организациях здравоохранения Гомеля и пяти районных центрах Гомельской области. Большинство изолятов *K. pneumoniae* с продукцией карбапенемаз были выделены от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии (63,6%) и отделения хирургического профиля (27,3%). Наибольшую активность в отношении карбапенемаза-продуцирующих *K. pneumoniae* проявляли тигециклин (100% чувствительных изолятов, МПК₅₀ — 1 мкг/мл, МПК₉₀ — 1 мкг/мл) и колистин (86,4% чувствительных изолятов, МПК₅₀ — 0,5 мкг/мл, МПК₉₀ — 4 мкг/мл), наименьшую — аминопенициллины, цефалоспорины, азтреонам, аминогликозиды, фторхинолоны, хлорамфеникол (чувствительные изоляты отсутствовали). Отмечена бактерицидная актив-

Адрес для переписки:

Тапальский Дмитрий Викторович
246050, Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5,
Гомельский государственный медицинский университет.
Тел.: +375 297 35-42-93. Факс: +375 232 75-31-21.
E-mail: tapalskiy@gsmu.by

Contacts:

Dmitriy V. Tapalski
246050, Belarus, Gomel, Lange str., 5,
Gomel State Medical University.
Phone: +375 297 35-42-93. Fax: +375 232 75-31-21.
E-mail: tapalskiy@gsmu.by

Библиографическое описание:

Тапальский Д.В., Савченко О.И., Бонда Н.А. Распространенность *Klebsiella pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз в Гомельской области Беларуси и их чувствительность к антибиотикам, комбинациям антибиотиков, дезинфектантам // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 671–679. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-671-679

Citation:

Tapalski D.V., Savchenko O.I., Bonda N.A. Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Gomel Region of Belarus and their sensitivity to antibiotics, antibiotic combinations, and decontaminants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 671–679. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-671-679

ность всех комбинаций антимикробных препаратов с включением колистина (меропенем–колистин, амикацин–колистин, левофлоксацин–колистин, тигециклин–колистин, фосфомицин–колистин) в отношении 86,4–95,5% исследуемых изолятов *K. pneumoniae*. Для 21 изолята (95,5%) *K. pneumoniae* выявлено не менее 3 различных комбинаций антимикробных препаратов с бактерицидной активностью. Для одного изолята (продуцента МБЛ NDM с МПК колистина 32 мкг/мл) выявлена только 1 бактерицидная комбинация (меропенем–амикацин). Среди карбапенемаза-продуцирующих *K. pneumoniae* не обнаружено изолятов, устойчивых к рабочим концентрациям какого-либо из включенных в исследование дезинфектантов. В концентрации $\frac{1}{4}$ от рабочей оказывали бактерицидное действие на все изоляты гексадекон, дуацид, оксидез, хлороцид, диайсид. В концентрации $\frac{1}{16}$ от рабочей дуацид, оксидез, хлороцид, диайсид оказывали бактерицидное действие на 95,5–100% изолятов. Таким образом, несколько групп дезинфектантов (окислители, хлорсодержащие препараты) обладали бактерицидной активностью в отношении множественно- и экстремально-резистентных изолятов *K. pneumoniae* даже в концентрациях в 4–16 раз ниже рекомендованных.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антимикробная резистентность, карбапенемаза, полимиксины, комбинации антибиотиков, дезинфектанты.

PREVALENCE OF CARBAPENEMASE-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN GOMEL REGION OF BELARUS AND THEIR SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS, ANTIBIOTIC COMBINATIONS, AND DECONTAMINANTS

Tapalski D.V.^a, Savchenko O.I.^b, Bonda N.A.^c

^a Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

^b Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Belarus

^c Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Belarus

Abstract. Here, we characterized in public health organizations prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, sensitivity to antimicrobial agents (AMAs), combined antimicrobial agents, and decontaminants. For this, there were selected 58 clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and/or polymyxins and examined within the microbiological monitoring program. Genes encoding KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM carbapenemases were detected by real-time multiplex PCR. Sensitivity to antimicrobial agents was determined by an automated method on a microbiological VITEK-2 Compact analyzer (bioMérieux, France) and by serial broth microdilution method. Sensitivity to 11 dual antimicrobial agent combinations was determined by a modified method of multiple combination bactericidal antibiotic testing. As a part of combinations, AMAs at pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) threshold concentrations (meropenem — 8 µg/ml, amikacin — 16 µg/ml, levofloxacin — 1 µg/ml, tigecycline — 0.5 µg/ml, phosphomycin — 32 µg/ml, colistin — 2 µg/ml) were tested. Susceptibility to 7 combined decontaminants of different composition was determined by the suspension method. Carbapenemase genes were detected in 22 *K. pneumoniae* clinical isolates, of which 19 isolates contained a *bla*_{OXA-48} gene and 3 isolates — gene *bla*_{NDM}. Carbapenemase producing *K. pneumoniae* were identified in 10 Gomel public health organizations and five regional centers of the Gomel region. The majority of such strains were isolated from patients in ICU (63.6%) and surgical departments (27.3%). Tigecycline (100% of the sensitive isolates, MIC₅₀ — 1 µg/ml, MIC₉₀ — 1 µg/ml) and colistin (86.4% of the sensitive isolates, MIC₅₀ — 0.5 µg/ml, MIC₉₀ — 4 µg/ml) exhibited the highest activity against carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, whereas aminopenicillins, cephalosporins, aztreonam, aminoglycosides, fluoroquinolones, chloramphenicol (no sensitive isolates) had exhibited the lowest efficacy. Bactericidal activity of all antibiotic combinations containing colistin was shown against 86.4–95.5% of *K. pneumoniae* isolates. At least 3 distinct combinations of antimicrobial agents with bactericidal activity were efficient against 21 *K. pneumoniae* isolates (95.5%). Only 1 bactericidal combination (meropenem–amikacin) was unveiled for one isolate (producer of NDM MBL with MIC of colistin 32 µg/ml). Geksadekon, duacid, oksidez, hlorocid and diajsid exerted a bactericidal effect at $\frac{1}{4}$ work dose against all isolates. Duacid, oksidez, hlorocid and diajsid showed bactericidal effect at $\frac{1}{16}$ work dose against 95.5–100% isolates. Thus, several decontaminant groups (oxidizing agents, chlorine-containing preparations) were characterized by bactericidal activity against multidrug-resistant and extremely drug-resistant of *K. pneumoniae* even at 4–16 times lower than recommended concentration.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, carbapenemase, polymyxins, combinations of antibiotics, disinfectants.

Введение

Клиническая значимость *K. pneumoniae* связана как с широкой распространенностью в госпитальной среде, так и с исключительной способностью быстрого формирования при-

обретенной резистентности к антимикробным препаратам (АМП) разных классов (входит в группу наиболее проблемных возбудителей — ESKAPE) [14]. Карбапенемы являются одними из наиболее эффективных препаратов для лечения инфекций, связанных с оказани-

ем медицинской помощи (ИСМП), вызванных грамотрицательными возбудителями. Начиная с середины 2000-х гг. в мире отмечено широкое распространение резистентности к карбапенемам, связанное с различными механизмами, и, в первую очередь, с продукцией приобретенных карбапенемаз. Расположение генов карбапенемаз на мобильных генетических элементах значительно упрощает их горизонтальную передачу, а сцепление с детерминантами устойчивости к АМП разных классов часто приводит к формированию экстремальной антибиотикорезистентности [15].

В настоящее время из всех доступных на фармацевтическом рынке Беларуси АМП только колистин сохраняет приемлемую микробиологическую активность в отношении большинства карбапенеморезистентных госпитальных изолятов *K. pneumoniae* [5]. Фармакокинетические и фармакодинамические особенности колистина детально изучены только в последние 5 лет. Использование стандартных режимов дозирования часто не позволяет быстро достичь адекватных концентраций антибиотика в очаге инфекции, что приводит к клинической неэффективности терапии и может способствовать селекции резистентности. Поэтому колистин назначается в сочетании с другими антибиотиками в расчете на аддитивное или синергидное действие комбинированной антибактериальной терапии [2].

Распространение в госпитальной среде экстремально-антибиотикорезистентных (XDR — extensively drug resistance) *K. pneumoniae* и появление отдельных панрезистентных (PDR — pandrug resistance) изолятов значительно затрудняет проведение антибактериальной терапии и требует назначения комбинаций из двух и более АМП. Описаны комбинации АМП, *in vitro* обладающие синергидным действием в отношении карбапенеморезистентных энтеробактерий [19]. В ходе многочисленных исследований было показано, что эффект сочетанного использования АМП для лечения инфекций, вызванных XDR и PDR возбудителями, трудно прогнозируем в связи с возможным присутствием разнообразных механизмов резистентности даже к препаратам из одной группы. Поэтому для подбора эффективных комбинаций АМП следует проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного больного [8]. На основе разработанного в 2000 г. в Канаде метода МСВТ (Multiple combination bactericidal testing, тестирование бактерицидности различных комбинаций) [7], с учетом современных данных о фармакокинетике и фармакодинамике АМП, нами создан и адаптирован микробиологический метод, позволяющий подбирать эффективные комбинации из двух

или трех АМП, обладающие бактерицидной активностью в отношении XDR бактерий [4]. В отличие от существующих методов, тестирование проводится для фиксированных концентраций АМП, аналогичных фармакокинетическим/фармакодинамическим (ФК/ФД) концентрациям, создаваемым в организме при назначении стандартных терапевтических доз.

В 2012 г. Центр по контролю и профилактике заболеваний США издал «Руководство по контролю над карбапенеморезистентными энтеробактериями» («Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae»), которое определяет комплекс мероприятий, направленных на ограничение циркуляции XDR энтеробактерий в стационарах [9]. В 2014 г. Европейским обществом по клинической микробиологии и инфекционным болезням было опубликовано похожее руководство [17]. В обоих документах указывается на роль объектов госпитальной среды в качестве факторов передачи возбудителей ИСМП, а также на важность проведения дезинфекции с использованием препаратов, активных в отношении целевых патогенов. У грамотрицательных бактерий возможно развитие перекрестной резистентности к дезинфицирующим средствам (ДС) и ряду АМП, связанное с присутствием общих молекулярных механизмов устойчивости или сцеплением генетических детерминант устойчивости к биоцидам различных типов [10]. Вместе с тем, для ДС не определены пограничные значения минимальных бактерицидных концентраций, поэтому интерпретация результатов определения устойчивости к этим препаратам затруднена. В работе М. Reichel и соавт. было показано, что все ДС для дезинфекции поверхностей (на основе спиртов, альдегидов, поверхностно-активных веществ, окислителей) оказывали бактерицидное действие как на антибиотикочувствительные изоляты грамотрицательных бактерий, так и на XDR- и PDR-изоляты, продуцирующие карбапенемазы различных классов [16]. Однако при проведении сопоставления минимальных бактерицидных концентраций (МБК) глутарового альдегида, бензалкония хлорида, хлоргексидина ацетата, этанола для контрольного штамма *K. pneumoniae* ATCC700603 и 27 карбапенеморезистентных XDR и PDR штаммов *K. pneumoniae*, для 52–78% антибиотикорезистентных штаммов выявлено превышение МБК ДС в 2–8 раз по сравнению с контролем [12]. В отечественной литературе имеется большое количество сведений о низкой активности ДС в отношении клинических изолятов микроорганизмов, сделаны попытки оценить взаимосвязь антибиотикорезистентности микроорганизмов и их устойчивости к ДС [1, 6]. Необходима количественная оценка бакте-

рицидной активности ДС в отношении XDR-изолятов *K. pneumoniae* с целью выбора наиболее эффективных препаратов.

Цель исследования — оценить распространенность *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз различных типов в организациях здравоохранения Гомельской области, а также определить их чувствительность к АМП, комбинациям АМП, дезинфектантам.

Материалы и методы

При проведении рутинных микробиологических исследований в 2016–2017 гг. (IV квартал 2016 г. — III квартал 2017 г.) из клинического материала пациентов, госпитализированных в 10 организаций здравоохранения г. Гомеля, был выделен 351 изолят *K. pneumoniae*. Из этого количества для выполнения дальнейших исследований отобрано 39 клинических изолятов *K. pneumoniae*, нечувствительных (устойчивых или умеренно устойчивых) к карбапенемам и/или полимиксидам. Еще 19 XDR-изолятов *K. pneumoniae* были выделены в аналогичный период времени в микробиологических лабораториях 5 территориальных (районных и зональных) центров гигиены и эпидемиологии Гомельской области от пациентов, находившихся на лечении в 5 центральных районных больницах. Все изоляты были выделены из различных видов клинического материала — мокроты, крови, раневого отделяемого, экссудатов, интраоперационного материала, мочи в диагностически значимых количествах.

Для всех изолятов выполнена реидентификация с использованием автоматического микробиологического анализатора «VITEK 2 Compact» на идентификационных картах VITEK 2 GN (bioMérieux, Франция). Определение чувствительности к 18 АМП выполнено на анализаторе «VITEK 2 Compact» с использованием диагностических карт AST-N215 и AST-XN05 в соответствии с инструкциями производителя. После реидентификации штаммы помещались в рабочую коллекцию и хранились в триптон-соевом бульоне (BD, США) с добавлением 30% глицерина в замороженном состоянии при -70°C .

Поскольку определение чувствительности к колистину с помощью автоматизированных систем не позволяет получать надежные результаты [18], для получения истинных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) дополнительно был использован метод последовательных микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон (BD, США). Также определяли МПК для меропенема и тигециклина. Тестирование проводили в соответствии с ISO 20776-1:2006 [13]. При учете и интерпретации результатов руководствовались стан-

дартами EUCAST [11]. Качество исследований контролировали штаммами *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Детекцию генов KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM выполняли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Определение чувствительности к комбинациям АМП выполняли модифицированным методом тестирования бактерицидности различных комбинаций [4]. В составе двойных комбинаций тестировали АМП, взятые в пороговых ФК/ФД концентрациях: меропенем — 8 мкг/мл, амикацин — 16 мкг/мл, левофлоксацин — 1 мкг/мл, тигециклин — 0,5 мкг/мл, фосфомицин — 32 мкг/мл, колистин — 2 мкг/мл.

Для штаммов с выявленной продукцией карбапенемаз выполнено определение чувствительности к ДС, зарегистрированным и используемым в организациях здравоохранения Республики Беларусь. Применяли суспензионный метод, приведенный в Федеральных клинических рекомендациях «Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях» [3] с некоторыми изменениями. Из суточных культур исследуемых микроорганизмов, выращенных на плотной питательной среде, в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили бактериальную суспензию с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Для унификации эксперимента выбирали рекомендованные производителем рабочие концентрации для дезинфекции изделий медицинского назначения в бактерицидном режиме обеззараживания в 30-минутной экспозиции. В таблице приведены сведения о включенных в исследования ДС, их составе и рекомендованных производителем концентрациях рабочих растворов. Растворы ДС готовили в стерильной дистиллированной воде. Дополнительно готовили растворы с концентрациями $\frac{1}{4}$ и $\frac{1}{16}$ от рабочих.

Приготовленные растворы ДС вносили в объеме 180 мкл в лунки полистироловых 96-луночных планшетов и добавляли 20 мкл бактериальной суспензии. Инкубацию выполняли при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации в каждую лунку вносили по 100 мкл стерильного раствора универсального нейтрализатора, содержащего 3% твина-80, 30 мг/мл сапонины, 5 мг/мл тиосульфата натрия, 1 мг/мл гистидина, 1 мг/мл цистеина.

Для количественной оценки бактерицидного эффекта делали высеивание 10 мкл содержи-

мого каждой лунки на сектор питательной среды (агар Мюллера–Хинтон). Выполняли инкубацию 24 ч при 35°C, после чего оценивали наличие роста. При росте 1 и более колонии на секторе питательной среды микроорганизм считали устойчивым к действию данной концентрации ДС.

Результаты

Из 58 отобранных для исследования изолятов *K. pneumoniae* присутствие генов карбапенемаз выявлено у 22 (37,9%). Из них 19 изолятов содержали ген *bla*_{OXA-48}, и 3 изолята — ген *bla*_{NDM}. Продукты карбапенемаз были выявлены в 10 организациях здравоохранения г. Гомеля и пяти районных центрах Гомельской области (Добрушского, Жлобинского, Петриковского, Речицкого и Рогачевского), при этом в одной организации здравоохранения г. Гомеля выявлена параллельная циркуляция продуцентов карбапенемазы OXA-48 (4 изолята на протяжении одного года) и МБЛ NDM (2 изолята). Большинство изолятов *K. pneumoniae* с про-

дукцией карбапенемаз были выделены от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии (63,6%) и отделения хирургического профиля (27,3%). Продукты карбапенемаз были выделены из мокроты и промывных вод бронхов (12 изолятов — 54,5%), раневого отделяемого и интраоперационного материала (6 изолятов — 27,3%), мочи (3 изолята — 13,6%) и крови (1 изолят — 4,5%).

Гистограммы распределения МПК тигециклина, колистина и меропенема представлены на рисунках 1–3. В отношении исследуемых изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз наибольшей активностью обладали тигециклин (чувствительны все изоляты, МПК₅₀ — 1 мкг/мл, МПК₉₀ — 1 мкг/мл) и колистин (чувствительны 86,4% изолятов, МПК₅₀ — 0,5 мкг/мл, МПК₉₀ — 4 мкг/мл). Выявлен 1 изолят *K. pneumoniae* с МПК колистина 32 мкг/мл, являющийся продуцентом МБЛ NDM (значение МПК в 8 раз превышает рекомендованную EUCAST пограничную концентрацию). Для меропенема значение МПК₅₀ составило 64 мкг/мл,

Таблица. Состав и рабочие концентрации исследуемых дезинфицирующих средств

Table. Composition and working concentrations of disinfectants

Наименование Name	Состав Composition	Концентрация для рабочего раствора, % Concentration for working solution, %	Экспозиция, мин Exposition, minutes
Виродез Virodez	триамин, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), неионогенное поверхностно-активное вещество (НПАВ) triamine, polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, quaternary ammonium compounds (QAC), nonionic surface-active agent (NSAA)	0,25	30
Гексадекон Geksadekon	смесь альдегидов и органических кислот, ЧАС, НПАВ mixture of aldehydes and organic acids, QAC, NSAA	0,5	30
Гликодез Glikodez	гликолевая кислота, ЧАС, НПАВ glycolic acid, QAC, NSAA	0,25	30
Дуацид Duacid	полигексаметиленбигуанида гидрохлорид, ЧАС, изопропиловый спирт, НПАВ polyhexamethylenebiguanide hydrochloride, QAC, isopropyl alcohol, NSAA	0,5	30
Оксидез Oksidez	перекись водорода, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, НПАВ hydrogen peroxide, polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, NSAA	0,5	30
Хлороцид Hlorocid	натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты sodium dichloroisocyanurate	0,2 (по активному хлору) (for active chlorine)	30
Диайсид Diajsid	надлимонная кислота, лимонная кислота, надмолочная кислота, молочная кислота, НПАВ supra-citric acid, citric acid supra-lactic acid, lactic acid, NSAA	0,25	30

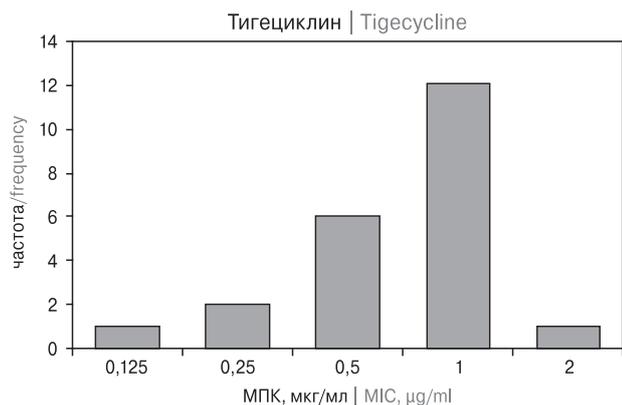


Рисунок 1. Распределение МПК тигециклина для клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, выделенных в Гомельской области

Figure 1. Distribution of MIC of tigecycline for clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases isolated in the Gomel region

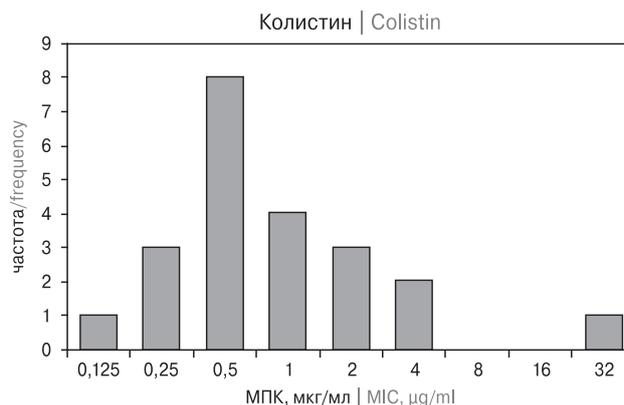


Рисунок 2. Распределение МПК колистина для клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, выделенных в Гомельской области

Figure 2. Distribution of MIC of colistin for clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases isolated in the Gomel region

МПК₉₀ — 128 мкг/мл. В соответствии с интерпретационными критериями EUCAST [11], 2 изолята сохраняли чувствительность к меропенему (МПК 2 мкг/мл, оба — продуценты карбапенемазы ОХА-48). По результатам, полученным с использованием автоматического микробиологического анализатора, среди продуцентов карбапенемаз не выявлено изолятов, чувствительных к аминопенициллинам, цефалоспорином, азтреонаму, аминогликозидам, фторхинолонам, хлорамфениколу. Сохраняли чувствительность к тетрациклину 68,2% изолятов, к триметоприму/сульфаметоксазолу — 13,6% изолятов.

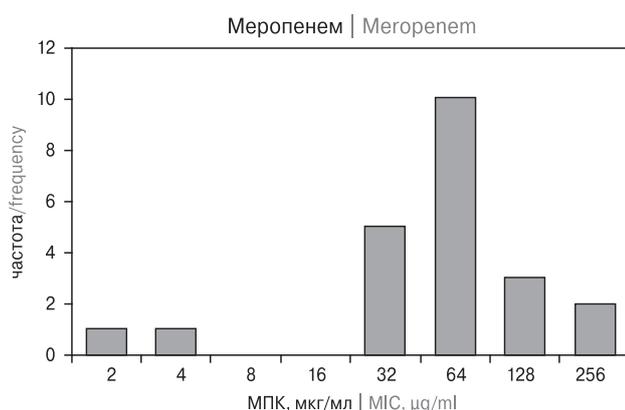


Рисунок 3. Распределение МПК меропенема для клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, выделенных в Гомельской области

Figure 3. Distribution of MIC of meropenem for clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases isolated in the Gomel region

Результаты тестирования 11 комбинаций АМП в отношении 22 клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз представлены на рисунке 4. Для 21 изолята (95,5%) *K. pneumoniae* выявлено не менее 3 различных комбинаций АМП с бактерицидной активностью. Для одного изолята (продуцент МБЛ NDM, устойчивость к колистину с МПК 32 мкг/мл) выявлена только 1 бактерицидная комбинация АМП (меропенем—амикацин). Отмечена бактерицидная активность всех комбинаций с включением колистина (меропенем—колистин, амикацин—колистин, левофлоксацин—колистин, тигециклин—колистин, фосфомицин—колистин) в отношении 86–95% исследуемых *K. pneumoniae*, что может быть связано с невысокими значениями МПК колистина для большинства изолятов. Комбинации меропенема с фосфомицином, левофлоксацином, амикацином проявляли бактерицидную активность в отношении всего 2–3 изолятов, 2 из которых, несмотря на продукцию карбапенемазы ОХА-48, формально сохраняли чувствительность к меропенему (МПК 2 мкг/мл). Интересно, что при отсутствии в тестируемой выборке устойчивости к тигециклину, комбинации меропенем—тигециклин и амикацин—тигециклин оказывали бактерицидное действие только на 2 и 1 изолят соответственно, что может быть связано с бактериостатическим типом действия тигециклина.

Результаты определения чувствительности *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз к ДС представлены на рисунке 5. Не обнаружено изолятов, устойчивых к рабочей концентрации какого-либо из включенных в исследование ДС. В концентрации 1/4 от рабочей оказывали бак-

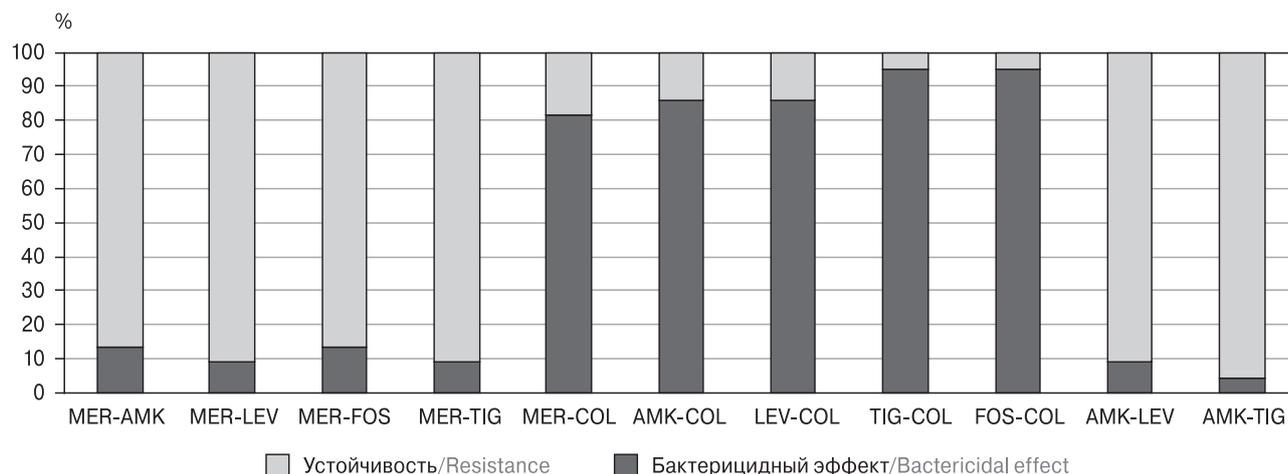


Рисунок 4. Эффективность различных комбинаций из двух антибактериальных препаратов в отношении клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз

Figure 4. The effectiveness of various combinations of two antibacterial drugs against clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases

Примечание. MER — меропенем, AMK — амикацин, LEV — левофлоксацин, FOS — фосфомицин, TIG — тигециклин, COL — колистин.

Note. MER — meropenem, AMK — amikacin, LEV — levofloxacin, FOS — phosphomycin, TIG — tigecycline, COL — colistin.

терицидное действие на все изоляты 5 из 7 ДС (гексадекон, дуацид, оксидез, хлороцид, диаисид), при этом 4 из них (дуацид, оксидез, хлороцид, диаисид) также проявляли бактерицидную активность в концентрации $1/16$ от рабочей в отношении 95,5–100% исследуемых изолятов.

Обсуждение

Обнаружено широкое распространение MDR и XDR изолятов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенем-гидролизующие ферменты, в орга-

низациях здравоохранения в Гомельской области. Так, в Гомеле продукция карбапенемаз выявлена у 4,0% клебсиелл, выделенных от госпитализированных пациентов. Настораживает факт выявления инфекций, вызванных XDR карбапенемазопродуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, в относительно небольших организациях здравоохранения, расположенных в районных центрах с численностью населения от 10 до 70 тыс. человек. Продуценты карбапенемазы OXA-48 были выделены в 4 районных центрах Гомельской области, еще в одном рай-

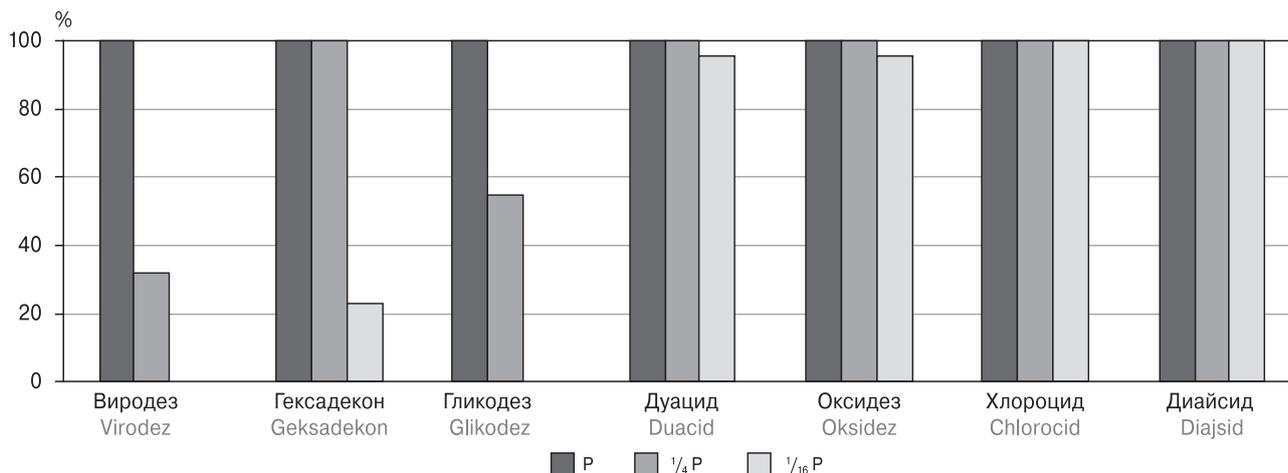


Рисунок 5. Чувствительность к дезинфицирующим средствам клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз (% чувствительных изолятов)

Figure 5. Sensitivity to disinfectants of clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases (% of sensitive isolates)

Примечание. P — рабочая концентрация, $1/4$ P — концентрация $1/4$ от рабочей, $1/16$ P — концентрация $1/16$ от рабочей.

Note. P — working concentration, $1/4$ P — concentration $1/4$ from working, $1/16$ P — concentration $1/16$ from working.

онном центре выявлен продуцент МБЛ NDM с развившейся устойчивостью к полимиксидам (МПК колистина 32 мкг/мл).

Использование комбинации АМП зачастую является единственно возможным способом преодолеть экстремальную антибиотикорезистентность возбудителя и обеспечить благоприятный исход заболевания. В многочисленных исследованиях установлено, что для подбора эффективных комбинаций АМП целесообразно проводить микробиологическое тестирование бактериальных изолятов, выделенных от конкретного пациента. В Беларуси тестирование эффективности комбинаций АМП до настоящего времени не проводилось, что было связано с отсутствием доступных методик и подготовленных кадров. Внедрение модифицированного метода тестирования бактерицидности различных комбинаций, основанного на определении чувствительности к комбинациям АМП в пороговых ФК/ФД концентрациях, позволило выполнять рутинные исследования с целью назначения комбинированной антибиотикотерапии конкретному пациенту. С использованием описанного метода удалось подобрать эффективные комбинации АМП для всех включенных в исследование карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae*, при этом для 95,5% изолятов выявлено не менее 3 различных комбинаций АМП с бактерицидной активностью.

Показано отсутствие устойчивости MDR- и XDR-изолятов *K. pneumoniae* к различным ДС, взятым в рекомендованных производителями рабочих концентрациях. Ограничением использованного нами метода является тестирование коммерчески доступных комбиниро-

ванных препаратов для дезинфекции, а не отдельных их компонентов, и, как следствие, невозможность определения МБК для входящих их состав биоцидных веществ. Тем не менее, выполненное исследование позволяет выделить несколько групп ДС (окислители, хлорсодержащие препараты), обладающие выраженной активностью в отношении MDR- и XDR-изолятов *K. pneumoniae* даже в концентрациях, которые 4–16 раз ниже рекомендованной производителем. Требуется проведение дальнейших исследований для количественной оценки формирования устойчивости госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий с XDR-фенотипом к ДС различных групп.

Благодарности

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Москва) Ю.А. Савочкиной за предоставленные наборы для выявления генов карбапенемаз, заведующему научно-исследовательской лабораторией Гомельского государственного медицинского университета О.В. Осипкиной за помощь в организации и проведении молекулярно-генетических исследований.

Исследование выполнено в рамках задания «Внедрение в практику здравоохранения Гомельской области системы микробиологического тестирования комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных возбудителей бактериальных инфекций», заказчик — Управление здравоохранения Гомельского областного исполнительного комитета, № госрегистрации 20164463 от 05.12.2016.

Список литературы/References

1. Сергевнин В.И., Клюкина Т.В., Волкова Э.О. Приобретенная устойчивость возбудителей внутрибольничных гнойно-септических инфекций к дезинфицирующим средствам и антибиотикам // Здоровье населения и среда обитания. 2013. Т. 244, № 7. С. 35–37. [Sergevnin V.I., Klyukina T.V., Volkova E.O. Acquired resistance of pathogens of nosocomial purulent-septic infections to disinfectants and antibiotics. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Health of the Population and Habitat*, 2013, vol. 244, no. 7, pp. 35–37. (In Russ.)]
2. Соловей Н.В., Карпов И.А., Горбич Ю.Л. Терапия мультирезистентных грамотрицательных инфекций: ренессанс колистина // Клиническая инфектология и паразитология. 2012. Т. 1, № 1. С. 12–27. [Solovey N.V., Karpov I.A., Gorbich Yu.L. Therapy of multiresistant gram-negative infections: the renaissance of colistin. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya = Clinical Infectology and Parasitology*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 12–27. (In Russ.)]
3. Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях: Федеральные клинические рекомендации. М., 2015. 27 с. [Method for determining the sensitivity of bacteria to disinfectants in monitoring the resistance to antimicrobial agents in medical organizations: Federal clinical guidelines. *Moscow*, 2015. 27 p. (In Russ.)]
4. Тапальский Д.В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. Т. 20, № 3. С. 182–191. [Tapalski D.V. Susceptibility to antibiotic combinations among nosocomial carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated in Belarus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, vol. 20, no. 3, pp. 182–191. (In Russ.)]
5. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О., Савельева А.К., Козловская И.В., Козик А.П., Левшина Н.Н., Осипкина О.В., Соловей Н.В., Карпов И.А. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси // Здравоохранение. 2017. № 3. С. 40–47. [Tapalsky D.V.,

- Osipov V.A., Yevseyenko E.O., Saveliyeva A.K., Kozlovskaya I.V., Kozik A.P., Levshina N.N., Osipkina O.V., Solovey N.V., Karpov I.A. Metallo-beta-lactamases and carbapenemases among extensively antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: occurrence in Belarus. *Zdravookhranenie = Health Care*, 2017, no. 3, pp. 40–47. (In Russ.)
6. Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В., Благодорова А.С., Широкова И.Ю., Кулюкина А.А. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы // Медицинский альманах. 2012. Т. 22, № 3. С. 122–125. [Shkarin V.V., Saperkin N.V., Kovalishena O.V., Blagodorova A.S., Shirokova I.Yu., Kulyukina A.A. The regional monitoring of microorganisms resistance to disinfectants: results and perspectives. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 122–125. (In Russ.)]
 7. Aaron S.D., Ferris W., Henry D.A., Speert D.P., Macdonald N.E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, vol. 161, no. 4, pp. 1206–1212. doi: 10.1164/ajrccm.161.4.9907147
 8. Cai Y., Chua N.G., Lim T.P., Teo J.Q., Lee W., Kurup A., Koh T.H., Tan T.T., Kwa A.L. From bench-top to bedside: a prospective in vitro antibiotic combination testing (iACT) service to guide the selection of rationally optimized antimicrobial combinations against extensively drug resistant (XDR) Gram negative bacteria (GNB). *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 7: e0158740. doi: 10.1371/journal.pone.0158740
 9. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). 2012.
 10. Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang T.T., Becher A., Karkhoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 2, pp. 428–432. doi: 10.1128/AAC.45.2.428-432.2001
 11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 8.0. 2018.
 12. Guo W., Shan K., Xu B., Li J. Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. *Pathog. Glob. Health.*, 2015, vol. 109, no. 4, pp. 184–192. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000022
 13. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» — Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
 14. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.*, 2013, vol. 11, no. 3, pp. 297–308. doi: 10.1586/eri.13.12
 15. Pitout J.D.D., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 10, pp. 5873–5884. doi: 10.1128/AAC.01019-15
 16. Reichel M., Schlicht A., Ostermeyer C., Kampf G. Efficacy of surface disinfectant cleaners against emerging highly resistant gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.*, 2014, vol. 28, no. 14: 292. doi: 10.1186/1471-2334-14-292
 17. Toth A., Damjanova I., Puskas E., Janvari L., Farkas M., Dobak A., Borocz K., Paszti J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010, vol. 29, no. 7, pp. 765–769. doi: 10.1007/s10096-010-0921-3
 18. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 9, pp. 2573–2582. doi: 10.1128/JCM.00888-17
 19. Zavascki A.P., Bulitta J.B., Landersdorfer C.B. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2013, vol. 11, no. 12, pp. 1333–1353. doi: 10.1586/14787210.2013.845523

Авторы:

Тапальский Д.В., к.м.н., доцент, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, г. Гомель, Беларусь;
Савченко О.И., врач-неонатолог 4-го детского отделения для недоношенных детей Гомельской областной клинической больницы, г. Гомель, Беларусь;
Бонда Н.А., врач-бактериолог микробиологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Гомель, Беларусь.

Authors:

Tapalski D.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus;
Savchenko O.I., Neonatologist of the 4th Children's Department for Premature Children, Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Belarus;
Bonda N.A., Bacteriologist of the Microbiological Laboratory, Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Belarus.

Поступила в редакцию 20.08.2018
 Отправлена на доработку 09.09.2019
 Принята к печати 13.09.2019

Received 20.08.2018
 Revision received 09.09.2019
 Accepted 13.09.2019

IgA-ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ДЕТЕЙ-БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

А.З. Зарипова¹, Ю.А. Тюрин^{1,2}, Л.Т. Баязитова^{1,2}, О.Ф. Тюпкина², Г.Ш. Исаева^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

² ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

Резюме. Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) — значимые возбудители тяжелых и опасных для жизни острых пневмоний, менингитов, а также отитов и синуситов у детей и лиц пожилого возраста. Ежегодно в мире регистрируется до 1,2 млн летальных исходов у детей из-за пневмонии и инфекции центральной нервной системы (менингита), этиологическим агентом которых является *S. pneumoniae*, большая доля летальных исходов от пневмококковой инфекции приходится на развивающиеся страны. Металлозависимые IgA1-протеазы патогенных бактерий относятся к важной группе бактериальных ферментов, расщепляющих человеческий иммуноглобулин A1 (IgA1) в области шарнира, тем самым препятствуя полноценной реализации антибактериального иммунитета организма хозяина. Цель исследования — изучение активности IgA1-протеиназ и их классового профиля (Na₂-ЭДТА и PMSF-ингибируемых) у различных серотипов пневмококков, выделенных от детей, являющихся носоглоточными носителями этих штаммов. **Материалы и методы.** Обследовано 585 детей, посещающих детские дошкольные учреждения, и проживающих г. Казани (n = 331) и в сельской местности (n = 254). Применены микробиологические, молекулярно-генетические, иммунохимические и биохимические методы для идентификации, определения серотипового состава и активности протеаз изолятов *Streptococcus pneumoniae*. Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью программного пакета Graph Pad Prism, версия 5.0. **Результаты.** Частота распространенности *S. pneumoniae* среди детей-носителей в возрастной категории от 1,5 до 3 лет составила 35,1%; в возрасте 3–5 лет — 23,4%; среди детей 5–7 лет — 19,6% и среди детей старше 7 лет — 21,9%. Выявлено доминирование вакцинных серотипов 14, 19F, 23F, входящих в состав современных пневмококковых вакцин («Превенар», «Пневмовакс-23»), — 55,8%. В 19% случаев выявлена циркуляция среди детской популяции носительства невакцинных штаммов, не входящих в состав вышеуказанных вакцин. Среди выделенных изолятов выявлено 5,8% нетипируемых штаммов. IgA-протеиназная активность была выявлена в клеточных лизатах 45 (86,5%) штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у бактерионосителей. Клеточные лизаты штаммов *S. pneumoniae*, которые не показали протеолитических свойств, были отнесены к серотипам 12F, Sg18. Таким образом, перспективны исследования по разработке альтернативных вакцин, содержащих иммуногенные протеины, адгезины или другие факторы вирулентности, общие для капсулированных и нетипируемых (инкапсулированных) штаммов пневмококков. Все вышеизложенное диктует необходимость микробиологического мониторинга бактерионосительства *S. pneumoniae* и поиска новых диагностических подходов для этиологической расшифровки *S. pneumoniae*-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, серотипы, IgA-протеазная активность, носительство, дети.

Адрес для переписки:

Тюрин Юрий Александрович
420015, Россия, г. Казань, ул. Большая Красная, 67,
Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии.
Тел.: 8 (843) 238-89-79 (служебн.).
E-mail: tyurin.yurii@yandex.ru

Contacts:

Yury A. Tyurin
420015, Russian Federation, Kazan, Bol'shaya Krasnaya str., 67,
Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (843) 238-89-79 (office).
E-mail: tyurin.yurii@yandex.ru

Библиографическое описание:

Зарипова А.З., Тюрин Ю.А., Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Исаева Г.Ш.
IgA-протеазная активность клеточных ферментов различных серотипов
Streptococcus pneumoniae, выделенных у детей-бактерионосителей //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 680–686.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-680-686

Citation:

Zaripova A.Z., Tyurin Yu.A., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Isaeva G.Sh.
IgA-protease activity coupled to cellular enzymes of different *Streptococcus pneumoniae* serotypes isolated in pediatric bacteria carriers // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 680–686. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-680-686

IgA-PROTEASE ACTIVITY COUPLED TO CELLULAR ENZYMES OF DIFFERENT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTYPES ISOLATED IN PEDIATRIC BACTERIA CARRIERS

Zaripova A.Z.^a, Tyurin Yu.A.^{a,b}, Bayazitova L.T.^{a,b}, Tyupkina O.F.^b, Isaeva G.Sh.^{a,b}

^a Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

^b Kazan Scientific-Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation

Abstract. *Streptococcus pneumoniae* are significant causative agents of severe and life-threatening acute pneumonia, meningitis, as well as otitis and sinusitis both in children and elderly. As many as 1.2 million pediatric lethal outcomes due to pneumonia and infections of the central nervous system (meningitis) caused by *S. pneumoniae*, are recorded worldwide annually, a large proportion of which occur in developing countries. Metal-dependent IgA1 proteases derived from pathogenic bacteria comprise an important group of bacterial enzymes cleaving human immunoglobulin A1 (IgA1) at the hinge region, thereby interfering with fully-executed host antibacterial immunity. **Objective.** To study activity of IgA1-proteinases and their class profile (Na₂-EDTA and PMSF-inhibited) in various pneumococcal serotypes isolated from nasopharyngeal carrier children. **Materials and methods.** There were examined 585 children attending preschool facilities residing in Kazan (n = 331) and rural areas (n = 254). Microbiological, molecular genetics and immunochemical methods were used to identify, serotyping composition and protease activity of *Streptococcus pneumoniae* isolates. Data statistical processing was carried out by using software Graph Pad Prism version 5.0. **Results.** Prevalence of *S. pneumoniae* in pediatric carriers aged 1.5–3 years was 35.1%, 3–5 years — 23.4%, 5–7 years — 19.6%, and over 7 years — 21.9%. Vaccine serotypes 14, 19F, 23F as a part of current pneumococcal vaccines (Prevenar, Pneumavax-23) comprised as high as 55.8%. However, in 19% of cases were positive for non-vaccine *S. pneumoniae* strains. Non-typeable strains were detected in 5.8% isolates. IgA-proteinase activity was detected in cell lysates of 45 (86.5%) *S. pneumoniae* strains isolated from pediatric carriers. Cell lysates of *S. pneumoniae* strains showing no proteolytic properties, were assigned to serotypes 12F, Sg18. Thus, studies on development of alternative vaccines containing immunogenic proteins, adhesins or other virulence factors common to capsulated and non-typeable (encapsulated) pneumococcal strains hold promise. All the aforementioned accounts for a need for microbiological monitoring of *S. pneumoniae* carriage and search for new diagnostic approaches for etiological interpretation of *S. pneumoniae*-associated diseases.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotypes, IgA protease activity, carrier, children.

Введение

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae* или *S. pneumoniae*) значимые возбудители тяжелых и опасных для жизни острых пневмоний, менингитов, а также отитов и синуситов у детей и лиц пожилого возраста [3]. Ежегодно в мире регистрируется до 1,2 млн летальных исходов у детей из-за пневмонии и инфекции центральной нервной системы (менингита), этиологическим агентом которых является *S. pneumoniae*, большая доля летальных исходов от пневмококковой инфекции приходится на развивающиеся страны [1, 15]. По данным центра по контролю за заболеваемостью, только в США в 2000 г. *S. pneumoniae* вызвал около 17 тыс. случаев инвазивных инфекций у детей младшего возраста (до 5 лет), в том числе 700 случаев менингита [20].

Применение антибиотиков и вакцин привело к снижению бремени заболеваний, связанных с пневмококковыми инфекциями, но, несмотря на достигнутые успехи, в мировой медицинской практике по-прежнему ежегодно регистрируется более 2 млн летальных исходов, а повышенная устойчивость пневмококков к антибиотикам, а также смена вакцинных серотипов пневмококков, может привести в будущем к еще более серьезной угрозе здоровью детского населения и лиц пожилого возраста [21, 23]. В настоящее время идентифицировано 97 различных серотипов пневмококков, при

этом состав современных вакцин ограничивается теми серотипами, которые наиболее часто ассоциируются с инвазивными формами пневмококковой инфекции [12, 13]. Согласно последним данным эпидемиологических исследований, после включения пневмококковых вакцин в национальные программы иммунизации детей развитых и развивающихся стран отмечается увеличение иммунной прослойки и формирования коллективного иммунитета среди детского населения, а также дополнительной защиты от пневмококковой инфекции среди взрослых [2, 6, 12, 18]. Но, несмотря на несомненное влияние вакцинации на снижение инвазивных форм пневмококковой инфекции во всех возрастных группах вакцинированных и невакцинированных, имеются данные об увеличении частоты колонизации носоглотки невакцинированными и нетипируемыми, в том числе и инкапсулированными, штаммами пневмококков приблизительно до 3–19% случаев бессимптомного носительства [17].

Следовательно, существенное значение приобретают дополнительные знания об биологических свойствах пневмококков и факторах их вирулентности.

В 90-х гг. прошлого столетия Courtney H.S. описал роль сериновых протеаз как факторов вирулентности для *S. pneumoniae* [10]. Ортологи сериновых протеаз как значимые факторы вирулентности были обнаружены у большин-

ства грамположительных бактерий [8]. Так, у *S. pneumoniae* идентифицирована термостабильная сериновая протеаза HtrA, связанная с мембраной клетки. Протеазы HtrA (High temperature requirement A) — индуцируемые тепловым шоком сериновые протеиназы, осуществляющие качественный белковый контроль путем гидролиза денатурированных белков, тем самым предохраняющие клетки от последствий стрессовых факторов. У многих микроорганизмов они являются фактором патогенности. Для стрептококков показано участие фермента в кворум-зависимых процессах и образовании биопленки. HtrA у пневмококков участвует во многих клеточных процессах в микробной клетке (деление клетки, активность бактериоцинов, и т.д.) [9, 11, 16]. Штаммы *S. pneumoniae*, дефицитные по HtrA, характеризуются меньшей вирулентностью (способность вызывать пневмонию и бактериемию) в эксперименте на животных моделях [18].

Металлзависимые IgA1-протеазы патогенных бактерий относятся к важной группе бактериальных ферментов, расщепляющих человеческий иммуноглобулин A1 (IgA1) в области шарнира, тем самым препятствуя полноценной реализации антибактериального иммунитета организма хозяина [24]. У *S. pneumoniae* металлзависимые IgA1-протеазы содержат консервативный Zn-связывающий HEXXH мотив, выявленный только в металлопротеазах. Особенностью этих ферментов является, то что их активность ингибируется за счет конкурентного связывания катионов с комплексом III (Na_2 -ЭДТА).

Цель исследования — изучение активности IgA1-протеиназ и их классового профиля (Na_2 -ЭДТА и PMSF-ингибируемых) у различных серотипов пневмококков, выделенных от детей, являющихся носоглоточными носителями этих штаммов.

Материалы и методы

Всего обследовано 585 детей, посещающих детские дошкольные учреждения, и проживающих в г. Казани ($n = 331$) и в сельской местности ($n = 254$).

Микробиологическое обследование. Биоматериал из носовых ходов, задней стенки глотки забирали тампон-зондами с транспортной средой Амиеса. С целью повышения результативности бактериологического исследования строго соблюдались следующие принципы: дети не получали антимикробные препараты 14 дней до момента обследования; с момента забора биоматериала до посева на питательные среды прошло не более 3 ч. Материал высевали на плотные питательные среды «Columbia agar Base» (Conda, Испания) с добавлением 5% бараньей крови.

Посевы инкубировали в CO_2 -инкубаторе 24 ч. Фенотипическую идентификацию *S. pneumoniae* проводили на основании морфологических, культуральных данных. Для дифференциальной диагностики использовали оптохиновый тест, лизис в присутствии солей желчи.

Определение серотиповой принадлежности методом М-ПЦР. ПЦР реакцию проводили по схеме, представленной в работе Pai R. (2006) [20]. ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл, причем каждая реакционная смесь содержала: 1 × ПЦР-буфер (20 мМТрис-НСl, pH 8,0; 100 мМКCl; 0,1 мМ ЭДТА; 1 М дитиотреитол; 0,5% Твин 20), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (SibEnzyme); 2,5 мМ MgCl_2 ; 2,0 ед. TaqF ДНК-полимеразы (Promega) и праймеров с концентрациями, как указано в таблице работы [19]. В качестве матрицы использовали образцы выделенной ДНК штаммов (2,5 мкл) протокол амплификацию проводили при условиях: начальный этап — 94°C в течение 4 мин с последующим 30 циклами амплификации 94°C в течение 45 с, 54°C в течение 45 с и 65°C в течение 2 мин 30 с. Продукты амплификации определяли методом электрофореза в 2% агарозных гелях в 1 × ТАЕ-буфере (40 мМТрис, 20 мМ ледяной уксусной кислоты, 1 мМ EDTA, pH 8,0) при 120 В при 45 мин. Гели окрашивали бромидом этидия (0,5 мкг/мл) и регистрировали изображения. Размеры ампликонов определяли по сравнению с молекулярным стандартом ДНК маркеров (SibEnzyme).

Выделение бактериальной ДНК. ДНК выделяли из бактериальной массы чистой культуры с использованием набора «GeneFlute™ Bacterial Genomic DNA kits» (Sigma, США). Средняя концентрация геномной ДНК составила ~10 нг/мкл. Концентрацию выделенной геномной ДНК определяли на спектрофотометре «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific).

Получение бактериальных лизатов. Пневмококковые изоляты культивировали на 5% кровяном агаре в течение 12 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Бактериальные клетки суспендировали в 250 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСl, pH 8,0) и доводили мутность до 1,0 по стандарту Макфарланда. Полученную суспензию немедленно замораживали при -20°C в течение 5 мин. Полученные лизаты сохраняли при -20°C до дальнейшего использования.

Определение протеолитической активности пневмококковых лизатов в отношении IgA человека [7]. Определение IgA-протеиназной активности лизатов *S. pneumoniae* проводили иммуноферментным методом. В реакции определяли способность лизатов расщеплять субстрат (Human IgA, Sigma) на фрагменты при pH 7,4 и 25°C. IgA-протеиназную активность рассчитывали на количество белка в лизате. Для ин-

гибирования металлзависимых протеиназ применяли 0,5 мМ раствор Na_2 -ЭДТА натрия, а для ингибирования сериновых протеиназ 0,5 мМ фенилметилсульфонил фторид (PMSF). Активность выражали в условных единицах (усл. ед.), где 1 усл. ед. соответствовала расщеплению 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C на 1 мг белка лизата.

Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью программного пакета Graph Pad Prism, версия 5.0.

Результаты

Частота распространенности *S. pneumoniae* среди детей-носителей в возрастной категории от 1,5 до 3 лет составила 35,1%; в возрасте 3–5 лет — 23,4%; среди детей 5–7 лет — 19,6% и среди детей старше 7 лет — 21,9%. Анализ медицинских карт обследованных детей показал, что вакцинированы от пневмококковой инфекции были 144 (24,6 %) ребенка из всех обследованных. Для вакцинации были использованы различные типы вакцин: у 123 (85,7%) детей применялась конъюгированная вакцина «Превенар», остальные дети привиты полисахаридной вакциной «Пневмо-23». Возрастная категория привитых от пневмококковой инфекции составила: дети в возрасте от 1 года до 3 лет — 44 (7,5%) ребенка; дети от 3–5 лет — 70 (11,9%) детей; дети 5–7 лет — 29 (4,95%), дети в возрастной группе 7 лет и старше — 7 детей (1,2%).

Проведение микробиологического обследования детей сопровождалось анкетированием родителей. По данным анкет и медицинских карт 156 (26,7%) детей отнесены к категории часто и длительно болеющих (ЧДБ), из них от пневмококковой инфекции было вакцинировано 29 детей. При формировании группы ЧДБ использовали критерии, предложенные А.А. Барановым и В.Ю. Альбицким, включающие число заболеваний острыми респираторными инфекциями вирусного и/или бактериального происхождения в течение года и возраст ребенка [4]: на 1 году жизни это 4 и более ОРЗ в год, на 2–3 годах жизни — 6 и более, на 4 году — 5 и более, на 5–6 годах — 4 и более, на 7 году жизни и старше — 3 и более ОРЗ в течение года. Распределение по возрастам среди ЧДБ детей было следующим:

- 1–3 года — 11 детей (14,9%), в том числе 6 вакцинированных детей;
- 3–5 лет — 64 ребенка (27,4%), в том числе 14 вакцинированных детей;
- 5–7 лет — 73 ребенка (29,8%), в том числе 9 вакцинированных детей;
- 7 лет и старше — 8 детей (25%), все не вакцинированы.

В 143 (24,4%) случаях были диагностированы бронхиты, бронхопневмонии, пневмонии, а в 122 (20,8%) случаях отмечены эпизоды острого среднего отита (один и более) и у 25 (4,3%) детей были выявлены тонзиллофарингиты и риносинуситы.

При изучении вирулентных свойств штаммов *S. pneumoniae* были отобраны методом случайной выборки 52 штамма от детей в возрасте от 1–3 лет (12 изолятов), от 5 до 7 лет (30 изолятов) и от 7 лет и старше (10 изолятов). Распределение выбранных штаммов по серотипам/серогруппам по данным молекулярно-генетического типирования представлено в таблице 1.

Выявлено доминирование вакцинных серотипов 14, 19F, 23F, входящих в состав современных пневмококковых вакцин («Превенар», «Пневмовакс-23») — 55,8%. В 19% случаев выявлена циркуляция среди детской популяции носительства невакцинных штаммов, не входящих в состав вышеуказанных вакцин. Среди выделенных изолятов выявлено 5,8% нетипируемых штаммов.

IgA-протеиназная активность была выявлена в клеточных лизатах 45 (86,5%) штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у бактерионосителей. Клеточные лизаты штаммов *S. pneumoniae*, которые не показали протеолитических свойств, были отнесены к серотипам 12F, Sg18. По величине протеолитической активности изолированные штаммы *S. pneumoniae* были подразделены на группы (табл. 2).

Доминирование штамма с серотипом 16F (11,5% DI 4,9–24,6) среди циркулирующих невакцинных штаммов коррелировало с его высокой способностью расщеплять иммуноглобулины А (высокая протеазная активность), сопоставимой с инвазивными серотипами 14, 19F, 23F, что указывает на возможное участие этого серотипа в развитии инвазивных форм пневмококковой инфекции и поддержании эпидемиологического процесса.

Выявление протеазной активности у нетипируемых штаммов (табл. 2), ранее считавшихся невирулентными, также может свидетельствовать о возможном участии нетипируемых штаммов в развитии инфекционного процесса.

Установлено, что протеолитическая активность лизатов штаммов серотипов 14, 19F, 7F, 23F, 16F при введении в реакционную среду PMSF была ингибирована на $66,5 \pm 2,3\%$, а при введении ЭДТА-Na — на $33,5 \pm 2,3\%$. Протеолитическая активность лизатов штаммов серотипов 22F, 33F, 35B при введении в реакционную среду PMSF была ингибирована на $11,1 \pm 1,23\%$, а при введении Na_2 -ЭДТА — на $88,9 \pm 1,23\%$. Таким образом, установлено, что штаммы *S. pneumoniae* различных серотипов/серогрупп характеризуются разным

Таблица 1. Распределение штаммов пневмококков по серотипам и связь с применяемыми вакцинами
 Table 1. Distribution of strains of pneumococci by serotypes and association with vaccines used

Серотип/ серогруппа Serotype/ serogroup	абс.; % (95% ДИ) abs.; % (95% DI)	Входит в состав вакцин Included in vaccines
14	12; 23,07% (13,2–37,8)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
19F	12; 23,07% (13,2–37,8)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
23F	5; 9,6% (3,6–22,2)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
7F	2; 3,8% (0,7–14,6)	ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
33F	3; 5,8% (1,5–17,2)	Пневмо-23/PPV-23 (Pneumovax)
35B	3; 5,8% (1,5–17,2)	Не входит в состав вакцин/Not included in vaccines
12F	3; 5,8% (1,5–17,2)	Пневмо-23/PPV-23 (Pneumovax)
16F	6; 11,5% (4,9–24,6)	Не входит в состав вакцин/Not included in vaccines
22F	2; 3,8% (0,7–14,6)	Пневмо-23/PPV-23 (Pneumovax)
Sg 18	1; 1,9% (0,1–11,8)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
Нетипируемые Untyped	3; 5,8% (1,5–17,2)	Не входит в состав вакцин/Not included in vaccines
Всего Total	52 (100%)	

уровнем IgA-протеолитической активности. Протеолитическая способность лизатов этих штаммов обусловлена активностью сериновых и металл-зависимых ферментов, белковая природа которых может быть в последующем идентифицирована с применением энзимографических и молекулярно-генетических методов исследования.

Заключение

Пневмококки — комменсальные условно-патогенные бактерии, являющиеся компонентом микробиоценоза носоглотки. Колонизация носоглотки является начальным этапом генерализации инфекции. Исход взаимоотношений между *S. pneumoniae* и макроорганизмом зависит от реактивности иммунной системы организма [22]. При этом важная роль отводит-

ся антиинфекционной защите в месте входных ворот, поскольку пневмококковое носительство — процесс локальный. Однако современные представления о развитии, особенностях патогенетических механизмов бактерионосительства *S. pneumoniae* у детей дошкольного возраста не объясняют причины развития инвазивных форм пневмококковой инфекции, не позволяют прогнозировать исход персистенции пневмококка в организме. Полученные нами данные о том, что 86,5% клинических изолятов *S. pneumoniae*, выделенных от практически здоровых детей-носителей, обладают выраженной IgA-протеиназной активностью, свидетельствуют о характере вирулентности штаммов. Штаммы с высокой активностью протеаз были отнесены к серотипам 14, 19F, 7F, 23F, 16F. По данным исследователей из Великобритании и Японии, штаммы, принадлежащие к серотипам 14, 19A, 19F и 23F, чаще обладают устойчивостью к антимикробным препаратам [14, 25], выделяются у 10–12% больных с внебольничной пневмонией. По данным НИИ антимикробной химиотерапии [5], преобладающими серотипами, вызывающими инвазивные инфекции, были 19A (21,4%), 19F (21,4%), 23F (14,3%) и 1 (14,3%). Учитывая суммарный вирулентный потенциал и антибиотикорезистентность циркулирующих у детей-бактерионосителей штаммов пневмококков, нельзя недооценивать роль носительства *S. pneumoniae*.

Существование возможных угроз, связанных с колонизацией невакцированными и нетипируемыми (инкапсулированными) вариантами пневмококков биотопа верхних дыхательных путей, ассоциированными с развитием неинвазивных и инвазивных форм,

Таблица 2. Протеазная активность штаммов *S. pneumoniae*

Table 2. Protease activity of strains of *S. pneumoniae*

Серотипы <i>S. pneumoniae</i> Serotypes <i>S. pneumoniae</i>	Активность (усл. ед.)* Activity (U)*
Серотипы 14, 19F, 7F, 23F, 16F Serotype 14, 19F, 7F, 23F, 16F	0,5±0,03
Серотипы 22F, 33F, 35B Serotype 22F, 33F, 35B	0,17±0,02
Серотипы 12F, Sg18 Serotype 12F, Sg18	0
Нетипируемые Untyped	0,1±0,01

Примечание. *1 усл. ед. активности составляет 1 мкмоль субстрата за 1 мин при T 25°C на 1 мг белка лизата.

Note. * (U) units activity is 1 μmol substrate per 1 min at T 25°C per 1 mg of the lysate protein.

хотя и на более низком уровне в сравнении с вакцинными штаммами, указывает на необходимость разработки вакцин нового поколения имеющих более широкий защитный спектр. Перспективны исследования по разработке альтернативных вакцин, содержащих иммуногенные протеины, адгезины или другие факторы вирулентности, общие для капсулированных и нетипируемых (инкапсулированных) штаммов пневмококков. Все вышеизложенное диктует необходимость микробиологического мониторинга за бактерионосительством *S. pneumoniae* и поиска новых диа-

гностических подходов для этиологической расшифровки *S. pneumoniae*-ассоциированных заболеваний.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Благодарности

Статья подготовлена при поддержке фармацевтической компании «Phizer».

Список литературы/References

1. Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Пяташина М.А., Авдонина Л.Г., Юзлибаева Л.Р. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* у детей в Республике Татарстан // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 271–278. [Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A., Tyurin Yu.A., Isaeva G.Sh., Zaripova A.Z., Pityashina M.A., Avdonina L.G., Yuzlibaeva L.R. Non-hospital pneumonia of pneumococcal etiology and microbiological aspects of nasopharyngeal transport of *Streptococcus pneumoniae* in children in the Republic of Tatarstan. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 271–278. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-271-278 (In Russ.)]
2. Белоцерковская Ю.Г., Романовская А.Г., Стырт Е.А. Пневмококковая вакцина у взрослых снижает риск инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae* // Клиническая медицина. 2016, Т. 94, № 1. С. 61–66. [Belotserkovskaya Yu.G., Romanovskaya A.G., Styrty E.A. Pneumococcal vaccine in adults reduces the risk of infections caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2016, vol. 94, no. 1, pp. 61–66. doi: 10.18821/0023-2149-2016-94-1-61-66 (In Russ.)]
3. Боронина Л.Г., Саматова Е.В. Эпидемиологические особенности *Streptococcus pneumoniae*, выделенного у детей, при неинвазивных пневмококковых инфекциях и носоглоточном бактерионосительстве // Вопросы диагностики в педиатрии. 2013. Т. 5, № 3. С. 22–26. [Boronina L.G., Samatova E.V. Epidemiological features of *Streptococcus pneumoniae*, isolated in children, with noninvasive pneumococcal infections and nasopharyngeal bacteriocarriers. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = The Diagnostics in Pediatrics*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 22–26. (In Russ.)]
4. Козлов Р.С., Кречикова О.И., Муравьев А.А., Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Таточенко В.К., Щербак М.Е., Родникова В.Ю., Романенко В.В., Сафьянов К.Н., группа исследователей PAPIRUS. Результаты исследования распространенности в России внебольничной пневмонии и острого среднего отита у детей в возрасте до 5 лет (PAPIRUS). Роль *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в этиологии данных заболеваний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013. Т. 15, № 4. С. 246–260. [Kozlov R.S., Krechikova O.I., Murav'ev A.A., Mironov K.O., Platonov A.E., Dunaeva E.A., Tatochenko V.K., Shherbakov M.E., Rodnikova V.Ju., Romanenko V.V., Saf'janov K.N., research group PAPIRUS. Incidence of community acquired pneumonia and acute otitis media in children 0–5 years in Russia and role of *S. pneumoniae* or *H. influenzae* in the etiology of the diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, vol. 15, no. 4, pp. 246–260. (In Russ.)]
5. Костинов М.П. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. М.: Медицина для всех, 2006. 172 с. [Kostinov M.P. Immunocorrection of the vaccination process in persons with disabilities. Moscow: *Medicina dlja vseh*, 2006. 172 p. (In Russ.)]
6. Муравьев А.А., Козлов Р.С., Лебедева Н.Н. Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 3. С. 200–206. [Muraviev A.A., Kozlov R.S., Lebedeva N.N. Epidemiology of *S. pneumoniae* serotypes in the territory of the Russian Federation. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, vol. 19, no. 3, pp. 200–206. (In Russ.)]
7. Тюрин Ю.А., Шамсутдинов А.Ф., Фассахов Р.С. Изучение полиморфизма однонуклеотидных фрагментов аутогена металлопротеазы штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с кожи больных атопическим дерматитом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 4. С. 5–7. [Tyurin Yu.A., Shamsutdinov A.F., Fassahov R.S. A study of the single nucleotide polymorphism fragments of the AUR gene metalloprotease strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the skin of patients with atopic dermatitis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2014, no. 1, pp. 5–7. (In Russ.)]
8. Bethe G., Nau R., Wellmer A., Hakenbeck R., Reinert R.R., Heinz H.P., Zysk G. The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.*, 2001, vol. 205, no. 1, pp. 99–104. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10931.x
9. Cassone M., Gagne A.L., Spruce L.A., Seeholzer S.H., Seberty M.E. The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 46, pp. 38449–38459. doi: 10.1074/jbc.M112.391482
10. Courtney H.S. Degradation of connective tissue proteins by serine proteases from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 175, no. 3, pp. 1023–1028. doi: 10.1016/0006-291X(91)91667-2

11. Dawid S., Sebert M.E., Weiser J.N. Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 5, pp. 1509–1518. doi: 10.1128/JB.01213-08
12. Feldman C., Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J. Infect.*, 2014, vol. 69, no. 4, pp. 309–325. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.006
13. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C., Konradsen H.B., Nahm M.H. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 3, pp. 871–899. doi: 10.1128/CMR.00024-15
14. Gupta A., Khaw F.M., Stokle E.L., George R.C., Pebody R., Stansfield R.E., Sheppard C.L., Slack M., Gorton R., Spencer D.A. Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 pneumonia in a United Kingdom school. *BMJ*, 2008, vol. 337: a2964. doi: 10.1136/bmj.a2964
15. Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, vol. 30, pp. 100–121. doi: 10.1086/313608
16. Ibrahim Y.M., Kerr A.R., McCluskey J., Mitchell T.J. Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 6, pp. 3584–3591. doi: 10.1128/IAI.72.6.3584-3591.2004
17. Keller L.E., Robinson D.A., McDaniel L.S. Non encapsulated *Streptococcus pneumoniae*: emergence and pathogenesis. *MBio*, 2016, vol. 7, no. 2: e01792. doi: 10.1128/mBio.01792-15
18. Kriger O., Regev-Yochay G. The effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal carriage and invasive disease. *Harefuah.*, 2019, vol. 158, no. 5, pp. 316–320.
19. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of streptococcus pneumoniae isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 1, pp. 124–131. doi: 10.1128/JCM.44.1.124-131.2006
20. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.*, 1997, no. 4, vol. 46 (RR-8), pp. 1–24.
21. Reshetnikova I.D., Bayazitova L.T., Tupkina O.F., Tyurin Y.A., Shamsutdinov A.F., Kadkina V., Rizvanov A.A. Characteristics of antibiotic resistance nasopharyngeal strains of *Streptococcus pneumoniae* in children suffering from respiratory pathologies. *BioNanoScience*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 182–185. doi: 10.1007/s12668-016-0324-8
22. Simell B., Auranen K., Käyhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K. L. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert. Rev. Vaccines*, 2012, vol. 11, no. 7, pp. 841–855. doi: 10.1586/erv.12.53
23. Van der Poll T., Opal S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 2009, vol. 374, pp. 1543–1556. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4
24. Wani J.H., Gilbert J.V., Plaut A.G., Weiser J.N. Identification, cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, pp. 3967–3974.
25. Yoshioka C.R., Martinez M.B., Brandileone M.C., Ragazzi S.B., Guerra M.L., Santos S.R., Shieh H.H., Gilio A.E. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. *J. Pediatr. (Rio J.)*, 2011, vol. 87, no. 1, pp. 70–75. doi: 10.2223/JPED.2063

Авторы:

Зарипова А.З., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

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

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

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

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

Authors:

Zaripova A.Z., Assistant Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Tyurin Yu.A., PhD (Medicine), Head of Scientific Research Laboratory of Immunology and Allergens Development, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Bayazitova L.T., PhD (Medicine), Head of Scientific Research Department of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Tyupkina O.F., Senior Researcher, Scientific Research Department of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation;

Isaeva G.Sh., PhD, MD (Medicine), Director, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Head of Microbiology Department, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСИТА, СОПРЯЖЕННОГО С ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

О.В. Парилова^{1,2}, Т.А. Капустина¹, А.Н. Маркина¹, Е.В. Белова¹

¹ ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, г. Абакан, Россия

Резюме. Хроническая воспалительная патология околоносовых пазух является в настоящее время одной из актуальных проблем современного здравоохранения, при этом наиболее часто патологический процесс локализуется в верхнечелюстной пазухе. Последние два десятилетия все большее этиологическое значение в инициации воспаления слизистых оболочек околоносовых пазух придается бактериальной внутриклеточной инфекции — микоплазменной и хламидийной. При этом хламидии, чей жизненный цикл связан с непосредственным нахождением в клетках хозяина, являются патогенными облигатными внутриклеточными грамотрицательными бактериями, в то время как микоплазмы — это мембрано-ассоциированный микроорганизм, способный к саморепликации и длительной персистенции на мембранах клеток макроорганизма. Увеличение роста хронической патологии околоносовых пазух, сопряженной с внутриклеточной инфекцией, определяется многими обстоятельствами, прежде всего увеличением числа иммунокомпрометированных лиц, ухудшением социальных и экологических условий жизни, бесконтрольным и необоснованным применением современных антимикробных и антисептических, гормональных средств, нарушающих совокупность внеклеточных микробных популяций (микробиоценозов), населяющих естественный биотоп слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Эти факторы способствуют снижению колонизационной резистентности, внедрению и размножению хламидий и микоплазм в виде моно- или микст-инфицирования. При этом смешанные варианты хламидийно-микоплазменной инфекции характеризуются развитием более тяжелых форм синуситов с развитием разнообразных осложнений со стороны нижних дыхательных путей, пищеварительного тракта, мочеполовой и нервной систем. Для определения эпидемиологической характеристики и особенностей системного и мукозального иммунных ответов у больных с обострением хронического верхнечелюстного синусита, сопряженного с внутриклеточной бактериальной инфекцией, было обследовано 189 человек. Наличие внутриклеточной бактериальной инфекции подтверждалось лабораторными тестами: прямым иммунофлуоресцентным анализом и полимеразной цепной реакцией. Анализ результатов исследования показал у пациентов с обострением хронической воспалительной патологии околоносовых раковин высокую частоту выявления *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*. При сравнении результатов лабораторных исследований больных с идентифицированной внутриклеточной бактериальной

Адрес для переписки:

Парилова Ольга Владимировна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
НИИ медицинских проблем Севера.
Тел.: 8 (391) 212-52-88 (служебн.); 8 913 034-37-80 (моб.).
E-mail: olga-cet@yandex.ru

Contacts:

Olga V. Parilova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana
Zheleznyaka str., 3G, Scientific Research Institute
of Medical Problems of the North.
Phone: +7 (391) 212-52-88 (office); +7 913 034-37-80 (mobile).
E-mail: olga-cet@yandex.ru

Библиографическое описание:

Парилова О.В., Капустина Т.А., Маркина А.Н., Белова Е.В. Особенности иммунного ответа у больных с обострением хронического верхнечелюстного синусита, сопряженного с внутриклеточной бактериальной инфекцией // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 687–694. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-687-694

Citation:

Parilova O.V., Kapustina T.A., Markina A.N., Belova E.V. Characteristics of immune response in patients with acute chronic maxillary sinusitis associated with intra-cellular bacterial infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 687–694. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-687-694

инфекцией и пациентов с отрицательными тестами была выявлена общая направленность патологических изменений со стороны иммунной системы, соответствующая стандартному ответу организма на имеющуюся воспалительный инфекционный процесс. Кроме этого были выявлены и особенности иммунореактивности у больных с верифицированной хламидийной инфекцией, заключающиеся в более выраженном дисбалансе в Т-клеточном звене иммунитета, а также в активации параметров гуморального звена иммунитета у больных с подтвержденным хламидийным и микоплазменным инфицированием.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, хронический верхнечелюстной синусит, внутриклеточная бактериальная инфекция, иммунный ответ.*

CHARACTERISTICS OF IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH ACUTE CHRONIC MAXILLARY SINUSITIS ASSOCIATED WITH INTRA-CELLULAR BACTERIAL INFECTIONS

Parilova O.V.^{a,b}, Kapustina T.A.^a, Markina A.N.^a, Belova E.V.^a

^a Scientific Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b State Khakassia N.F. Katanov's University, Abakan, Russian Federation

Abstract. Currently, chronic inflammatory pathology of paranasal sinuses mostly affecting maxillary antrum is one of the pressing issues for health care. Over the last two decades, a great etiological importance in inducing inflammation in paranasal sinuses was referred to bacterial intracellular infections caused by Mycoplasma and Chlamydia. In particular, Chlamydia, whose life cycle is closely linked to residence inside host cells defines them as pathogenic obligate intracellular gram-negative bacteria, whereas Mycoplasma is a membrane-associated microorganism able to self-replication and long persistence on host cellular membranes. Increased incidence of chronic pathology in paranasal sinuses associated with intracellular infection is shaped by a range of circumstances, primarily increased prevalence of immunocompromised subjects, worsened social and ecological conditions, uncontrolled and unjustified administration of available of antimicrobials and anti-septic agents, hormone preparations altering community of extracellular microbe populations (microbiocenoses), inhabiting natural biotope in the upper respiratory tract mucosa. These factors contribute to the lowering colony resistance, entrance and propagation of Chlamydia and Mycoplasma as a mono- or mixed infection. Upon that, mixed variants of Chlamydia-Mycoplasma infection are characterized by development of more severe sinusitis accompanied with diverse complications in the lower respiratory tract, digestive tract, urinary and nerve system. There were examined 189 subjects for assessing epidemiologic characteristics and features of systemic and mucosal immune responses in patients with exacerbated chronic maxillary sinusitis associated with intracellular bacterial infection. Presence of intracellular bacterial infection was confirmed by laboratory tests: direct immune fluorescent analysis and PCR. It was found that high prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in patients with exacerbated chronic inflammatory pathology of paranasal sinuses. Comparing laboratory test data for patients with identified intracellular bacterial pathogens vs. those with negative results revealed a common trend in pathologic immune-related changes that fits to typical host anti-infection response manifested by inflammatory process. Besides, we described features of immune reactivity in patients with verified Chlamydia infection including more pronounced unbalance in T cell immunity as well as elevated parameters of humoral immunity in patients with verified Chlamydia and Mycoplasma infection.

Key words: *Chlamydia trachomatis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, chronic maxillary sinusitis, intracellular bacterial infection, immune response.*

В последние годы с появлением новых современных методов диагностики инфекционных заболеваний появилась возможность всестороннего изучения характера микрофлоры, вызывающей воспалительные заболевания ЛОР-органов, включая атипичные патогены и в первую очередь хламидии и микоплазма. Для оториноларингологов большой интерес представляют два вида хламидий — *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydomphila pneumoniae*, а также *Mycoplasma pneumoniae*. К настоящему времени получены достаточно убедительные данные, свидетельствующие о том, что сочетание внутриклеточной инфекции с традиционной микрофлорой зачастую создает максимально благоприятные условия для становления

и хронизации заболеваний верхнего отдела респираторного тракта. Многообразие и неспецифичность клинических проявлений осложняет диагностику хламидиозов. Несмотря на совершенствование способов диагностики и лечения воспалительных хронических заболеваний носа, уровень их распространенности в настоящее время не уменьшается. Более того, наблюдается тенденция к увеличению числа рецидивирующих и хронических форм.

По данным эпидемиологических исследований, проведенных за последние 10 лет, заболеваемость риносинуситом увеличилась в 2 раза, а удельный вес госпитализированных по этому поводу больных вырастает ежегодно на 1,5–2% [4, 9, 10]. Такие больные составляют более 1/3

от общего числа госпитализированных в оториноларингологические отделения, а их доля колеблется от 29 до 60% [10, 13].

Установлено, что 5–15% населения земного шара страдает той или иной формой хронического синусита, а затраты на их лечение составляют более чем 3,5 млрд долларов в год [10, 13, 14]. В среднем по России показатель обращаемости больных ПРС составляет 4,9 на 10 000 населения, при этом отмечается около 70 000 новых случаев ПРС в год [10]. Исходя из этих статистических данных, в России ПРС может встречаться примерно у 1 млн 400 тыс. человек. По данным шведских исследователей, ПРС страдает 2,7%, в Южной Корее — 0,5%, в Финляндии — 4,3%, во Франции — 2,1% от общей численности населения [13]. Во второй половине прошлого столетия ведущая роль в этиологии инфекционных заболеваний респираторного тракта принадлежала *Streptococcus pneumoniae*, доля которого составляла около 80%, однако в конце XX в. удельный вес этой инфекции стал составлять лишь 25–36% [7, 10, 14]. В 25–35% заболеваний на искусственных питательных средах не удается выделить какого-либо возбудителя [7, 13]. Это обусловлено сменой спектра инфекционных агентов и связано с увеличением этиологической значимости внутриклеточной инфекции, в том числе и хламидий и микоплазмы [5, 8, 10].

Рост заболеваний, вызываемых атипичной инфекцией определяется многими обстоятельствами, прежде всего увеличением числа иммунокомпрометированных лиц, ухудшением социальных и экологических условий жизни, бесконтрольным применением antimикробных средств и гормонов, приводящих к появлению полирезистентных штаммов микроорганизмов, а также к значительному снижению клеточных и гуморальных факторов иммунитета [2, 3, 6, 11, 12].

Данные о частоте встречаемости хламидийной инфекции при воспалительной патологии ЛОР-органов существенно варьируют — от 7 до 74,4% [1, 3, 5, 9, 14]. По данным различных исследований на долю микоплазменной инфекции среди заболеваний респираторного тракта приходится от 10 до 40% случаев. Более высокий уровень заболеваемости отмечается у детей раннего возраста и лиц с ослабленным иммунитетом старше 65 лет [14, 15].

В среднем считается, что уровень инфицирования хламидиями взрослых здоровых лиц находится в пределах 8–10%, микоплазмами — 2–6%. Вероятность развития инфекций увеличивается в 2–3 раза при неблагоприятных социально-экономических условиях, в 4–5 раз — при циркуляции возбудителя в семье и рецидивирующем их течении. Смешанные варианты хламидийно-микоплазменной инфекции характеризуются развитием более тяжелых форм

респираторных заболеваний (деструктивные и плевропневмонии) с функциональными расстройствами (синдром вегетативной дистонии, дискинезия желчевыводящих путей, вертебро-базилярная недостаточность и др.).

Такая вариабельность показателей распространенности хламидийной инфекции при заболевании ЛОР-органов обусловлена различной организацией проводимых исследований, отсутствием стандартизированного комплекса методов лабораторной диагностики и взятия клинического материала. Известные способы выявления хламидийно-микоплазменного инфицирования слизистой оболочки верхнего отдела респираторного тракта основаны на использовании различных лабораторных тестов [1, 8, 10, 14]. Диагностика хламидийной инфекции осуществляется непосредственным выявлением возбудителя, его структур, антигенов и нуклеиновых кислот в клинических образцах и косвенным подтверждением инфекции (определение специфических антител). Прямые тесты обнаружения хламидийной инфекции включают бактериоскопический (цитологический), иммунологический (прямой и непрямой иммунофлюоресцентный анализ, иммуноферментный анализ), культуральный, молекулярно-биологический (полимеразная цепная реакция, лигазная цепная реакция и транскрипционная амплификация) методы. К непрямым тестам относятся серологические методы (реакция связывания комплемента, реакция непрямой гемагглютинации, реакция непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ). Нами был разработан алгоритм лабораторной диагностики хламидий у лиц с подозрением на колонизацию ими слизистой оболочки верхнего отдела респираторного тракта, включающий два прямых метода и один непрямой метод индикации возбудителя.

Несвоевременное обнаружение хламидий в слизистой оболочке верхнего отдела полости носа, а также нераспознанная хламидийная инфекция приводят к тому, что больные получают традиционную противомикробную терапию, не элиминирующую хламидийную инфекцию. Это провоцирует удлинение периода обострения заболеваний, появление непрерывно-рецидивирующих форм, способствует развитию осложнений и утяжелению течения заболевания, содействует диссеминации хламидий в организме с последующим развитием экстра-респираторных очагов поражения.

Цель: изучение эпидемиологической характеристики и особенностей системного и муккозального иммунного ответов у населения Сибири с воспалительной патологией верхнего отдела респираторного тракта, сопряженной с внутриклеточной инфекцией.

Материалы и методы

Проводилось определение двух видов хламидий (*Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae*), а также *Mycoplasma pneumoniae*. Для верификации антигенов этих микроорганизмов применялись прямой иммунофлуоресцентный анализ. Дополнительно для верификации хламидий применялась полимеразно-цепная реакция (ВекторБест-ДНК-амли).

Клиническим материалом для прямого диагностирования хламидийной инфекции околоносовых пазух служили мазки-соскобы со слизистой оболочки общего и среднего носовых ходов, а также мазки отпечатки с биоптатов (полипов, грануляций и т.д.), взятых из гайморовых пазух во время операции.

Для описания бинауральных признаков вычислялись их относительные частоты и 95% доверительный интервал (95% ДИ). Качественные порядковые признаки описывались в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Оценка значимости различий относительных показателей проводилась по критерию Стьюдента, точному критерию Фишера и критерию χ^2 . Сравнение порядковых данных осуществлялось с помощью критерия Манна–Уитни. За максимально приемлемую вероятность ошибки 1 рода (p) принималась величина, равная 0,05 и менее.

Всего было обследовано на одновременное наличие внутриклеточной бактериальной инфекции 189 больных в возрасте от 15 до 65 лет, поступивших в ЛОР-отделение с обострением хронического гайморита, направленных в стационар, вследствие неэффективности лечения в поликлинических условиях. Диагностика ЛОР-заболеваний проводилась по общепринятой в оториноларингологии схеме. Шифровка диагнозов осуществлялась в соответствии с системой классификации болезней, травм и причин смерти (МКБ-10). Диагноз верхнечелюстного синусита подтверждался рентгенологическим обследованием околоносовых пазух. Группу контроля составили лица с обострением острого синусита, отрицательными тестами на наличие внутриклеточной бактериальной инфекции в количестве 47 человек, не имевших ЛОР-заболеваний.

Результаты и обсуждение

Внутриклеточное инфицирование выявлено у 88 из 189 больных, что составляет 46,6% (ДИ 39,4–53,7). Положительные результаты на наличие хламидийных структур в слизистой оболочке носа имели место у 69 человек, что составило 36,5% (95% ДИ 29,6–43,4). У 47 человек была верифицирована *C. pneumoniae* (24,9%, 95%

ДИ 18,7–31,0), у 14 — *C. trachomatis* (7,4%, 95% ДИ 3,7–11,2). Одновременное наличие маркеров *C. pneumoniae* и *C. trachomatis* определялось у 8 пациентов (в 4,23%, 95% ДИ 1,4–7,1).

Положительные результаты на наличие микоплазменных структур в слизистой оболочке носа имели место у 44 больных [23,3% (95% ДИ 17,3–29,3)]. Положительные результаты на наличие моноинфицирования *Mycoplasma pneumoniae* получены у 19 человек (10,1%, 95% ДИ 5,8–14,4). Микоплазменное микст-инфицирование с *C. pneumoniae* составило 8,5% (95% ДИ 0–3,4), а с *C. trachomatis* 6,4% (95% ДИ 2,9–9,8). Одновременное наличие всех внутриклеточных микроорганизмов имело место у 3 человек (1,6%, 95% ДИ 0–3,4).

Сравнительный анализ лабораторных показателей проводился между 4 группами. Больные хроническими риносинуситами, ассоциированными с микоплазмой, составляли 1 группу ($n = 19$), с хламидиями — 2 группу ($n = 44$), с микоплазмой и хламидиями — 3 группу ($n = 25$); условно здоровые лица, у которых не были диагностированы ЛОР-заболевания, сопутствующая инфекционная и тяжелая соматическая патология вошли в 4 группу ($n = 47$).

Показатели развернутого анализа крови у инфицированных внутриклеточной инфекцией и здоровых лиц представлены в таблице 1. При сравнении средних показателей гемограммы у больных, инфицированных микоплазмами по сравнению с инфицированными хламидиями, статистически значимых различий получено не было.

Тогда как при сравнении с группой микст-инфицирования у лиц с моноинфицированием *M. pneumoniae* наблюдалось снижение абсолютного содержания сегментоядерных нейтрофилов ($p = 0,03$). При сравнении со здоровыми лицами у лиц с микоплазмозом имели место относительная эозинофилия ($p = 0,01$), снижение относительного ($p < 0,001$) и абсолютного ($p = 0,01$) содержания лимфоцитов, увеличение относительного содержания нейтрофилов ($p = 0,01$) и абсолютного ($p = 0,002$) и относительного содержания моноцитов ($p = 0,02$). При сравнении средних показателей гемограммы больных, инфицированных всеми видами внутриклеточных инфекций и инфицированных хламидиями, статистически значимых различий получено не было. При сравнении с группой здоровых лиц в группе с микст-инфицированием наблюдалось абсолютная и относительная эозинофилия ($p < 0,001$), увеличение относительного ($p = 0,003$) и абсолютного содержания нейтрофилов ($p < 0,001$), снижение относительного содержания лимфоцитов ($p = 0,01$) и моноцитов ($p = 0,02$).

Так, у больных с наличием хламидийных агентов по сравнению с контролем имело место

статистически значимое повышение относительной концентрации лейкоцитов ($p = 0,002$) за счет сегментоядерных ($p = 0,04$), моноцитов ($p = 0,02$) и эозинофилов ($p = 0,001$). Кроме этого, у больных обеих групп относительные показатели содержания эозинофилов также были выше ($p < 0,001$).

Абсолютные и относительные показатели состояния клеточного звена иммунитета отражены в таблице 2. У больных, инфицированных микоплазмами, иммунологические нарушения Т-клеточного звена иммунитета характеризовались снижением относительного и абсолютного количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов ($p = 0,001$),

абсолютного количества $CD3^+$ Т-лимфоцитов ($p = 0,007$), а также увеличением относительно содержания $CD72^+$ Т-лимфоцитов ($p = 0,01$) и $CD8^+$ Т-лимфоцитов ($p = 0,01$) по сравнению с контрольными показателями, и снижением индекса $CD4/CD8$ ($p = 0,01$).

Кроме этого, у больных с идентифицированными микоплазмами имело место снижения абсолютного ($p = 0,03$) и относительного ($p = 0,06$) содержания $CD16^+$ -клеток по сравнению с больными, инфицированными хламидиями, а по сравнению с микст-инфицированными — снижение абсолютного количества $CD4^+$ ($p = 0,04$) и $CD16^+$ -лимфоцитов ($p = 0,04$).

Таблица 1. Показатели развернутого анализа крови у больных с хроническими риносинуситами и у здоровых лиц (Me, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Table 1. Indicators of the developed analysis of blood at patients with chronic rhinosinusitis and at healthy persons (Me, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Больные с наличием микоплазменной инфекции (группа 1) Patients with the presence of mycoplasmal infections (group 1) n = 19	Больные с наличием хламидийной инфекции (группа 2) Patients with the presence of chlamydial infections (group 2) n = 44	Больные с наличием микст-инфекции (группа 3) Patients with the presence of mixed infection (group 3) n = 44	Контроль (группа 4) Control (group 4) n = 101
Лейкоциты, $10^9/л$ Leukocytes, $10^9/L$	5,7 (4,6–6,3)	6,5 (4,9–8,0)	7,4 (5,6–8,7) $p_{1-3} = 0,02$	5,3 (4,3–7,3) $p_{2-4} = 0,05$ $p_{3-4} < 0,001$
Эозинофилы, % Eosinophils, %	2,0 (1,0–4,0)	3,0 (2,0–5,0)	3,5 (2,0–6,0)	1,0 (0,0–2,0) $p_{1-4} = 0,02$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$
Эозинофилы, $10^9/л$ Eosinophils, $10^9/L$	0,06 (0,0–0,2)	0,1 (0,0–0,3)	0,15 (0,0–0,3)	0,5 (0,0–0,1) $p_{2-4} = 0,005$ $p_{3-4} = 0,004$
Сегментоядерные лейкоциты, % Segmented leukocytes, %	60,0 (51,0–72,0)	61,0 (48,0–67,0)	62,0 (55,0–68,0)	55,0 (46,0–60,0) $p_{1-4} = 0,03$ $p_{2-4} = 0,06$ $p_{3-4} < 0,01$
Сегментоядерные лейкоциты, $10^9/л$ Segmented leukocytes, $10^9/L$	3,1 (2,6–4,4)	3,4 (2,3–4,7)	5,1 (3,1–5,7) $p_{1-3} = 0,02$ $p_{2-3} = 0,04$	3,0 (2,3–3,8) $p_{3-4} < 0,001$
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	24,5 (21,0–31,0)	31,0 (22,0–36,0)	28,0 (23,0–33,0)	40,0 (35,0–46,0) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$
Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/L$	1,2 (1,1–1,7)	1,8 (1,2–3,1)	1,6 (1,4–2,7) $p_{1-3} = 0,06$	2,1 (1,4–2,8) $p_{1-4} < 0,01$
Моноциты, % Monocytes, %	8,0 (5,0–11,0)	6,0 (3,0–8,0)	5,0 (4,0–9,0)	4,0 (2,0–6,0) $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} = 0,01$
Моноциты, $10^9/л$ Monocytes, $10^9/L$	0,44 (0,3–0,6)	0,31 (0,2–0,5)	0,4 (0,2–0,4)	0,2 (0,0–0,35) $p_{1-4} = 0,01$ $p_{2-4} = 0,01$ $p_{3-4} = 0,01$
СОЭ Erythrocyte sedimentation rate	6,0 (3,0–10,0)	6,0 (3,0–15,0)	4,0 (2,0–26,0)	–

Примечание. p — статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни.

Note. p — statistically significant differences versus by Mann–Whitney criterion.

Таблица 2. Показатели клеточного иммунитета у больных с хроническими синуситами и у здоровых лиц (ME, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)Table 2. Indices of cellular immunity in patients with chronic sinusitis and in healthy individuals (Me, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Больные с наличием микоплазменной инфекции (группа 1) Patients with the presence of mycoplasmal infections (group 1) n = 19	Больные с наличием хламидийной инфекции (группа 2) Patients with the presence of chlamydial infections (group 2) n = 44	Больные с наличием микст-инфекции (группа 3) Patients with the presence of mixed infection (group 3) n = 25	Контроль (группа 4) Control (group 4) n = 101
CD3 ⁺ , %	66,0 (58,0–72,0)	61,0 (52,0–66,0)	66 (58–72) $p_{2-3} = 0,06$	66 (63–70) $p_{2-4} < 0,01$
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /L	1,34 (0,9–1,7)	1,1 (0,7–1,6)	1,3 (0,9–1,7) $p_{1-3} = 0,05$	1,5 (1,0–1,9) $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} = 0,02$
CD4 ⁺ , %	39,0 (34,0–45,0)	36,0 (24–44)	39 (34–45)	42 (35–46) $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} = 0,01$
CD4 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,8 (0,6–1,14)	0,6 (0,4–1,0)	0,8 (0,6–1,1) $p_{1-3} = 0,03$	1,0 (0,6–1,2) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,01$
CD8 ⁺ , %	32,0 (27,0–36,0)	26,5 (23,0–30,0) $p_{1-2} = 0,04$	28 (24–32) $p_{1-3} = 0,08$	24 (22–30) $p_{1-4} < 0,01$
CD8 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,42 (0,27–0,6)	0,5 (0,3–0,8)	0,5 (0,4–0,8)	0,6 (0,4–0,7)
CD16 ⁺ , %	16,0 (12,0–22,0)	21,5 (15,0–28,0) $p_{1-2} = 0,06$	19 (11–24)	21 (17–23)
CD16 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,17 (0,13–0,3)	0,42 (0,2–0,6) $p_{1-2} = 0,03$	0,4 (0,2–0,6)	0,4 (0,3–0,6) $p_{1-4} < 0,01$
CD72 ⁺ , %	17,0 (14,0–22,0)	16 (10–21)	16 (12–17) $p_{1-3} = 0,07$	14 (10–15) $p_{1-4} = 0,005$
CD72 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,24 (0,2–0,3)	0,23 (0,14–0,46)	0,3 (0,2–0,4)	0,29 (0,17–0,4)
CD4/CD8	1,1 (1,0–1,3)	1,4 (0,9–1,8)	1,3 (1,0–1,9) $p_{1-3} = 0,05$	1,6 (1,3–2,0) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} = 0,02$
ЦИК Circulating immune complex	13,5 (4,0–28,0)	16 (10–32)	26 (20–110) $p_{1-3} = 0,07$	24 (7,5–36,0) $p_{3-4} = 0,06$

Примечание. p — статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни.

Note. p — statistically significant differences versus by Mann–Whitney criterion.

Таблица 3. Показатели гуморального иммунитета у лиц с хроническими риносинуситами и у здоровых лиц (ME, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)Table 3. Indices of humoral immunity in patients with chronic sinusitis and in healthy individuals (Me, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Больные с наличием микоплазменной инфекции (группа 1) Patients with the presence of mycoplasmal infections (group 1) n = 19	Больные с наличием хламидийной инфекции (группа 2) Patients with the presence of chlamydial infections (group 2) n = 44	Больные с наличием микст-инфекции (группа 3) Patients with the presence of mixed infection (group 3) n = 25	Контроль (группа 4) Control (group 4) n = 101
IgA, g/l	3,2 (2,7–3,6)	2,8 (1,8–3,9)	2,1 (1,8–3,2)	1,44 (1,32–2,65) $p_{1-4} = 0,01$ $p_{2-4} < 0,01$ $p_{3-4} = 0,02$
IgM, g/l	1,6 (1,1–1,6)	1,47 (0,85–1,9)	1,4 (1,1–2,0)	1,25 (0,54–1,8)
IgG, g/l	13 (12–14)	12,2 (8,6–15,2)	11,2 (8,8–14,4)	9,0 (7,5–10,3) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,01$
IgE, ME/ml	18 (18–18)	35 (10–234) $p_{1-2} < 0,001$	38 (18–42) $p_{1-3} < 0,001$	–

Примечание. p — статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни.

Note. p — statistically significant differences versus by Mann–Whitney criterion.

При сравнении группы больных с микст-инфицированием с группами с хламидийным инфицированием и здоровыми статистически значимых различий выявлено не было.

Помимо этого, были обнаружены некоторые различия в системном Т-клеточном иммунном ответе между больными, инфицированными хламидиями, и контрольной группой. Так, у больных с идентифицированной хламидийной инфекцией имело место статистически значимое снижение относительного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺ (соответственно $p = 0,01$, $p = 0,05$) и CD4⁺ (соответственно $p = 0,006$, $p = 0,03$).

Содержание циркулирующих иммунных комплексов было резко увеличено у больных с микст-инфицированием и равнялось 69,6 г/л [статистически значимые различия по сравнению с группой больных с хламидиями ($p = 0,05$) и здоровыми ($p = 0,01$)].

Средние показатели гуморального иммунитета у больных с верифицированной внутриклеточной инфекцией, а также в группе контроля представлены в таблице 3. Статистически значимые различия показателей гуморального иммунитета были получены при сопоставлении уровней IgA и IgG больных всех групп со здоровыми лицами (табл. 3). При этом концентрация IgG была выше у пациентов с внутриклеточной инфекцией. Кроме того, уровень IgA у пациентов с микст-инфицированием, по сравнению с больными 1 и 2 групп, было ниже ($p = 0,01$ и $p = 0,05$).

Выводы

Проведенные нами исследования показали, что у больных с обострением хронического гайморита и неаллергического ринита (различные формы вазомоторного ринита), госпитализи-

рованных в связи с неэффективностью амбулаторного лечения, внутриклеточная инфекция выявляется у половины пациентов, из них ведущее место принадлежит хламидийному инфицированию.

По видовому распределению первое место занимает *S. pneumoniae* — она выявлялась в 2 раза чаще, чем *S. trachomatis*, и была идентифицирована у 55 человек (29,1%, 95% ДИ 22,6–35,6), против 22 (11,6%, 95% ДИ 7,1–16,2) ($p < 0,001$). Второе место занимает *M. pneumoniae* — 44 больных (23,3%, 95% ДИ 17,3–29,3).

У больных, несмотря на имеющиеся различия в содержании тех или иных параметров крови, наблюдаются однонаправленные патологические изменения показателей общего развернутого анализа крови по сравнению со здоровыми лицами.

У лиц с хроническими риносинуситами, независимо от вида внутриклеточного микроорганизма, отмечен ряд сходных изменений со стороны параметров клеточного звена иммунитета, которые в своей совокупности отражают дисбаланс его эффекторных компонентов на фоне иммунологической недостаточности.

Изменения в лейкограмме и в иммунограмме у лиц с внутриклеточным инфицированием по сравнению со здоровыми лицами соответствуют стандартному ответу организма на имеющийся воспалительный инфекционный процесс, что проявляется угнетением Т-клеточного и активацией В-клеточного звеньев иммунитета. Проведенные исследования доказали существование особенностей в иммунореактивности больных, заключающиеся в том, что при присоединении хламидийной инфекции имеет место более выраженный дисбаланс в Т-клеточном звене иммунитета. При внутриклеточном инфицировании наблюдается активация гуморально-иммунного ответа.

Список литературы/References

1. Белова Е.В., Капустина Т.А., Маркина А.Н., Парилова О.В. Алгоритм лабораторной диагностики хламидийной инфекции у больных хроническим синуситом // Вестник оториноларингологии. 2015. Т. 80, № 4. С. 61–64. [Belova E.V., Kapustina T.A., Markina A.N., Parilova O.V. The algorithm for laboratory diagnostics of chlamydial infection in the patients presenting with chronic sinusitis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2015, vol. 80, no. 4, pp. 61–64. doi: 10.17116/otorino201580461-64. (In Russ.)]
2. Борцов П.А., Федина Е.Д., Токарская Е.А., Мартынова В.Р., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Регуляция хламидиями апоптоза клеток хозяина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. № 4. С. 53–58. [Bortsov P.A., Fedina E.D., Tokarskaya E.A., Martynova V.R., Zigangirova N.A., Gintsburg A.L. Apoptosis of host cells regulation by chlamydia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2006, vol. 80, no. 4, pp. 53–58. (In Russ.)]
3. Капустина Т.А., Савченко А.А., Парилова О.В., Коленчукова О.А., Кин Т.И., Лопатникова Е.В. Иммунопатологические нарушения у больных с хроническим риносинуситом, сопряженным с хламидийной инфекцией // Якутский медицинский журнал. 2010. № 3 (31). С. 31–35. [Kapustina T.A., Savchenko A.A., Parilova O.V., Kolenchukova O.A., Kin T.I., Lopatnikova E.V. Immunopathological disorders in patients with chronic rhinosinusitis, interfacing with Chlamydia infection. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal = Yakut Medical Journal*, 2010, no. 3 (31), pp. 31–35. (In Russ.)]
4. Козлов В.С., Савлевич Е.Л. Полипозный риносинусит. Современные подходы к изучению патогенеза, диагностике и лечению // Вестник оториноларингологии. 2015. № 4. С. 95–99. [Kozlov V.S., Savlevich E.L. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps. The recent trend in the studies of the pathogenesis, diagnosis and treatment of this disease. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2015, no. 4, pp. 95–99. doi: 10.17116/otorino201580495-99 (In Russ.)]

5. Лиханова М.А., Бондарев О.И., Мингалев Н.В., Лебедева Р.Н. Полипозным риносинусит — вопросы этиопатогенеза // Омский научный вестник. 2014. № 2 (134). С. 56–59. [Likhanova M.A., Bondarev O.I., Mingalev N.V., Lebedeva R.N. Polypoid rhinosinusitis — questions etiopathogenesis. *Omskiy nauchnyy vestnik = Omsk Scientific Bulletin*, 2014, no. 2 (134), pp. 56–59. (In Russ.)]
6. Лобзин Ю.В., Сидорчук А.Л., Позняк С.Н. Клинико-лабораторная диагностика хламидия-индуцированных артропатий // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010. № 6. С. 48–51. [Lobzin Yu.V., Sidorchuk S.N., Poznyak A.L. Clinical laboratory diagnosis of Chlamydia-induced arthropathies. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2010, no. 6, pp. 48–51. (In Russ.)]
7. Лопатин А.С., Иванченко О.А., Гаврилов П.П., Карпищенко С.А., Козлов Р.С., Кречикова О.И., Кухаренко О.А., Отвагин И.В., Сказатова О.И., Сопко О.Н., Пискунов Г.З. Микробный пейзаж верхнечелюстных пазух и среднего носового хода при хроническом риносинусите // Российская ринология. 2013. Т. 21, № 4. С. 4–8. [Lopatin A.S., Ivanchenko O.A., Gavrilov P.P., Karpishchenko S.A., Kozlov R.S., Krechikova O.I., Kukharensko O.A., Otvagin I.V., Skazatova O.I., Sopko O.N., Piskunov G.Z. Characteristics of microflora in maxillary sinuses and middle nasal meatuses during chronic rhinosinusitis. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2013, vol. 21, no. 4, pp. 4–8. (In Russ.)]
8. Маянский А.Н. Микробиология и клинические проявления хламидиозов // Вопросы диагностики в педиатрии. 2012. Т. 4, № 5. С. 10–19. [Mayanskiy A.N. Microbiology and clinical features of chlamydiosis. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = The Diagnostics in Pediatrics*, 2012, vol. 4, no. 5, pp. 10–19. (In Russ.)]
9. Михайлов Ю.Х. Некоторые теоретические и методологические проблемы современной ринологии // Военно-медицинский журнал. 2006. № 6. С. 52–56. [Mikhaylov Yu.H. Some theoretical and methodological problems of modern rhinology. *Voенно-медитсинский zhurnal = Military Medical Journal*, 2006, no. 6, pp. 52–56. (In Russ.)]
10. Пальчун В.Т., Гуров А.В., Руденко В.В. Хламидийная и микоплазменная инфекция в оториноларингологии (систематический обзор) // Вестник оториноларингологии. 2012. № 6. С. 91–97. [Pal'chun V.T., Gurov A.V., Rudenko V.V. Chlamydia and mycoplasma infections in otorhinolaryngology (a systematic review). *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2012, no. 6, pp. 91–97. (In Russ.)]
11. Федорова В.А., Султанакмедов Э.С., Салтыков Ю.В., Утц С.Р., Мотин В.Л. Совершенствование лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции у пациентов с нарушением репродуктивной функции, инфицированных *Chlamydia trachomatis* // Вестник дерматологии и венерологии. 2017. № 2. С. 34–44. [Fedorova V.A., Sultanakhmedov E.S., Saltykov Yu.V., Utts S.R., Motin V.L. Improvement of laboratory diagnostics of urogenital chlamydial infection in patients with impaired reproductive function infected with *Chlamydia trachomatis*. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii*, 2017, no. 2, pp. 34–44. doi: 10.25208/0042-4609-2017-0-2-34-44 (In Russ.)]
12. Хрянин А.А. Урогенитальная хламидийная инфекция у женщин: тактика ведения пациенток в соответствии с современными зарубежными и российскими рекомендациями // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. № 2. С. 101–110. [Khryanin A.A. Urogenital chlamydial infection in women: tactics of conducting patients in accordance with modern foreign and Russian recommendations. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii*, 2015, no. 2, pp. 101–110. doi: 10.25208/0042-4609-2015-0-2-101-110. (In Russ.)]
13. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., de Wang Y., Wormald P.J. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinol. Suppl.*, 2012, vol. 50, no. 23, pp. 1–12. doi: 10.4193/Rhino50E2
14. Javadi Nia S., Zarabi V., Noorbakhsh S., Farhadi M., Ghavidel Darestani S. Chlamydia pneumoniae infection assessment in children with adenoid hypertrophy concomitant with rhino sinusitis. *Jundishapur J. Microbiol.*, 2014, vol. 7, no. 8: e11134. doi: 10.5812/ijm.11134
15. Principi N., Esposito S. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae cause lower respiratory tract disease in paediatric patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2002, vol. 15, no. 3, pp. 295–300.

Авторы:

Парилова О.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; доцент кафедры общепрофессиональных дисциплин ФГБОУ ВО Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, г. Абакан, Россия;

Капустина Т.А., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Маркина А.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Белова Е.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Parilova O.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of General Professional Disciplines, Abakan, Russian Federation;

Kapustina T.A., PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Markina A.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Belova E.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.03.2018
Отправлена на доработку 10.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 23.03.2018
Revision received 10.03.2019
Accepted 22.03.2019

КЛЕТочный ИММУНный ОТВЕТ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ

Т.С. Запорожец¹, С.А. Сокотун², А.И. Симакова², Е.В. Персиянова^{1,3}

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

² Тихоокеанский государственный медицинский институт, г. Владивосток, Россия

³ Медицинское объединение ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Резюме. Иксодовый клещевой боррелиоз — природно-очаговое трансмиссивное инфекционное полисистемное заболевание со сложным патогенезом, многие аспекты которого остаются невыясненными. Наиболее сложной в клинической практике является стадия персистенции, связанная с длительным присутствием боррелий в метастатических очагах и их повторной многократной диссеминацией. Механизмы, лежащие в основе хронизации ИКБ, до конца не ясны. Предполагается, что хронизация может быть вызвана неадекватным иммунным ответом, связанным с активацией аутоиммунных механизмов, что приводит к формированию стойких необратимых изменений (дегенеративных и атрофических) в пораженных органах. В этой связи за пациентами, перенесшими клещевой боррелиоз, необходимо динамическое наблюдение с целью определения прогноза заболевания и проведения поддерживающей терапии. Настоящее исследование предпринято с целью оценки возможности использования показателей клеточного иммунитета для прогноза хронизации ИКБ. *Материалы и методы.* Исследования проведены на базе ФГБУЗ «Медицинское объединение ДВО РАН». Материалом исследования являлись данные индивидуальных карт 22 пациентов от 29 до 83 лет, сыворотка и плазма крови. Проанализированы результаты иммунологического обследования пациентов с иксодовым клещевым боррелиозом в анамнезе через 12–18 месяцев от острого периода заболевания. Специфические антитела к *Borrelia burgdorferi* классов IgM и IgG определяли с использованием диагностической тест-системы фирмы ООО «ОМНИКС» (Санкт-Петербург). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на цитофлуориметре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител с двойной меткой (Beckman Coulter, Франция). *Результаты.* В результате комплексной оценки функционального состояния показателей клеточного иммунитета у пациентов с ИКБ в анамнезе установлена вариабельность степени активации лимфоцитов периферической крови, свидетельствующая о наличии индивидуальности реакции иммунной системы. Дисбаланс клеточного иммунного ответа, регистрируемый у серонегативных реконвалесцентов ИКБ, может быть косвенным свидетельством продолжающегося инфицирования боррелиями. Наличие в сыворотке крови реконвалесцентов боррелиоза на поздних сроках специфических IgG и IgM антител на фоне дисбаланса иммунной системы является настораживающим фактором в отношении склонности к развитию аутоиммунных реакций. К маркерным показателям возможной хронизации боррелиоза на поздних сроках заболевания может быть отнесено сочетание обнаруженных специфических IgM антител с увеличением цитотоксического потенциала иммунной системы.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, специфические антитела, иммунная система, клеточный иммунный ответ.

Адрес для переписки:

Запорожец Татьяна Станиславовна
690087, Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, 1,
НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.
Тел.: 8 (423) 244-24-34. Факс: 8 (423) 244-14-38.
E-mail: niem_vl@mail.ru

Contacts:

Tatiana S. Zaporozhets
690087, Russian Federation, Vladivostok, Selskaya str., 1,
Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (423) 244-24-34. Fax: +7 (423) 244-14-38.
E-mail: niem_vl@mail.ru

Библиографическое описание:

Запорожец Т.С., Сокотун С.А., Симакова А.И., Персиянова Е.В.
Клеточный иммунный ответ у реконвалесцентов иксодовых клещевых
боррелиозов // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 695–702.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-695-702

Citation:

Zaporozhets T.S., Sokotun S.A., Simakova A.I., Persyanova E.V., Cellular
immune response in convalescents from Ixodes tick-borne borreliosis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019,
vol. 9, no. 5–6, pp. 695–702. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-695-702

CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN CONVALESCENTS FROM IXODES TICK-BORNE BORRELIOSISZaporozhets T.S.^a, Sokotun S.A.^b, Simakova A.I.^b, Persiyanova E.V.^{a,c}^a Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation^b Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation^c Medical Department of Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Ixodes tick-borne borreliosis is a natural focal transmissible infectious multi-system disease featured with complex pathogenesis, which multiple aspects remain unclarified. The persistence stage during this infection associated with prolonged *Borrelia* presence in metastatic foci and repeated multiple dissemination is most complicated for clinical practice. It is assumed that the chronic process can be caused by an inadequate immune response associated with activated autoimmune mechanisms leading to emergence of permanent irreversible (degenerative and atrophic) changes in affected organs. Patients who experienced tick-borne borreliosis need dynamic observation for assessing disease prognosis providing a maintenance therapy. The purpose of the study was to evaluate an opportunity of using cellular immunity indices for predicting disease transition to a chronic course. *Materials and methods.* The study was carried out at the Medical Association of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences. Case report form data, serum and blood plasma samples collected from 22 patients aged 29–83 years old were examined. Immunological examination data from patients with ixodes tick-borne borreliosis (12–18 months after the onset of acute period) were analyzed. Specific IgM and IgG against *Borrelia burgdorferi* were determined by using the OMNICS diagnostic test system (St. Petersburg). Lymphocyte immunophenotyping was performed on BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) by using double-labeled monoclonal antibodies (Beckman Coulter, France). *Results.* A variability of activated peripheral blood lymphocytes was found in patients with tick-borne borreliosis evidencing about individual immune response. An imbalanced cellular immune response recorded in seronegative convalescents from tick-borne borreliosis, may be an indirect finding of ongoing *Borrelia* infection. Finding of specific serum IgG and IgM antibodies in convalescents at late stage coupled to impaired immune system is a warning sign presuming a risk to developing autoimmune reactions. Detection of specific IgM antibodies at late timepoint combined with increased immune cytotoxic potential may be referred to a marker of possible disease transition to chronic course.

Key words: ixodial tick-borne borreliosis, specific antibodies, immune system, cellular immune response.

Введение

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) в настоящее время рассматривается как природно-очаговое трансмиссивное инфекционное полисистемное заболевание со сложным патогенезом, многие аспекты которого остаются невыясненными [2, 3]. Согласно общепринятому взгляду, в течении боррелиозной инфекции выделяют три стадии развития: локальной инфекции, диссеминации боррелий, органных поражений [4]. Наиболее сложной в клинической практике является стадия персистенции, связанная с длительным присутствием возбудителей в метастатических очагах, их повторной многократной диссеминацией и возможным длительным сохранением у пациентов соматических и нейрокогнитивных симптомов. Данное состояние описывается как «хронический боррелиоз» или «постлаймский синдром». Наблюдение за такими пациентами крайне важно, от этого зависит тактика лечения и необходимость повторных пролонгированных курсов антибактериальной терапии [2, 3, 4]. До настоящего времени механизмы, лежащие в основе хронизации ИКБ, окончательно не установлены. Предполагается, что одной из основных причин является неадекватный иммунный ответ, связанный с нарушением супрессорных механизмов иммунной регуляции

Treg CD4⁺CD25⁺ Т-клетками, дисбалансом иммунорегуляторных цитокинов, изменениями субпопуляционного состава, низким уровнем бактерицидного потенциала нейтрофилов, что приводит к активации аутоиммунных механизмов и формированию постоянных необратимых изменений (дегенеративных и атрофических) в пораженных органах [3, 8, 12, 14]. Вместе с тем научное сообщество зачастую отвергает резистентную к лечению хроническую форму боррелиоза из-за невозможности обнаружить культивируемые, клинически значимые боррелии после стандартного лечения [10]. Тем не менее, врачи в попытках установить связь между *Borrelia burgdorferi* и клинически диагностированным хроническим боррелиозом обращаются к альтернативным тестам, таким как новые методы культивирования, обнаружение ДНК *B. burgdorferi* в образцах мочи, определение CD57 положительных лимфоцитов — зрелых NK-клеток в субпопуляции CD56^{dim}CD16⁺ NK-клеток человека [10, 11]. В качестве диагностических критериев возможной хронизации ИКБ в остром периоде заболевания предлагается оценивать антиген-стимулированную пролиферативную активность лимфоцитов и продукцию IFN γ и TGF- β 1 (нагрузочный тест с ультразвуковым лизатом *Borrelia garinii* в супернатантах культур клеток цельной крови) [1]. Принимая во внимание связывание белков, в большом

количестве синтезируемых *B. burgdorferi*, специфическими антителами, которые впоследствии могут быть захвачены иммунными комплексами (ИК), что делает антитела необнаруживаемыми стандартными методами анализа, Brunner M. и Sigal L.H. [6] использовали в качестве маркера продолжающейся или сохраняющейся инфекции уровень ИК-IgM, измеряемый с помощью модифицированного метода иммуноблотинга.

Несмотря на то что до настоящего времени нет четких доказательств решающей роли иммунологических нарушений в реализации патофизиологических механизмов хронического боррелиоза, точное определение иммунологических параметров должно быть определяющим при их использовании в диагностике и лечении этого заболевания.

Целью настоящего исследования являлась оценка возможности использования показателей клеточного иммунитета для прогноза возможной хронизации ИКБ.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе ФГБУЗ «Медицинское объединение ДВО РАН». В исследовании принимали участие 22 пациента в возрасте от 29 до 83 лет (средний возраст $56,4 \pm 1,9$, мужчин 33,4%, женщин 66,6%). Срок с момента выписки пациентов из стационара, после перенесенного ИКБ, составил от 12 до 24 месяцев. Материалом исследования являлись данные индивидуальных карт, сыворотка и плазма крови. Забор венозной крови для биохимических и иммунологических исследований проводили в равных условиях (утром, натощак, в количестве 12–15 мл). С целью сравнения исследуемых показателей использовали кровь 30 условно здоровых доноров.

Критерии включения: пациенты, которые ранее наблюдались или получали лечение по поводу ИКБ с позитивными заключениями лабораторного тестирования в анамнезе (ИФА, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для детекции РНК боррелий).

Критерии исключения: пациенты с отсутствием клинических, эпидемиологических и лабораторных данных о заболевании ИКБ.

Оценка здоровья пациентов проводилась по клиническим показателям — общее состояние, состояние различных органов и систем организма (использовались методы врачебного контроля, характеризующие клиническое состояние пациентов); по лабораторным показателям.

Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на цитофлюориметре «BD FACSCalibur» (Becton Dickinson, США) с использованием

моноклональных антител с двойной меткой: CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺CDHLA-DR⁺ (Becton Dickinson, США), CD3-FITC/CD25-PE, CD3-FITC/CD95-PE, CD3-FITC/HLA-DR-PE (Beckman Coulter, Франция).

Выявление специфических антител классов IgM и IgG к *Borrelia burgdorferi* проводили с использованием диагностической тест-системы (ООО «ОМНИКС», Санкт-Петербург) в лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова (зав. лабораторией — д.м.н., профессор Леонова Галина Николаевна).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием лицензионного программного пакета Statistica 8.0 (StatSoft, Incorporated, США) и Microsoft® Excel 2011 (Microsoft Corporation, США). Использовали метод проверки нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений (W-критерий Шапиро–Уилка), для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков t-критерий Стьюдента, при распределении, отличающемся от нормального — критерий Манна–Уитни (U). Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (Σ), ошибка среднего арифметического (m), медиана (Me), нижний и верхний квартили (LQ–UQ), объем анализируемой группы (n), достигнутый уровень значимости (p). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты и обсуждение

Клинико-неврологическое наблюдение и лабораторное обследование пациентов проводилось с момента поступления их в клинику и до окончания этиотропного лечения в стационаре, а далее амбулаторно от 12 до 24 месяцев.

В ходе изучения клинических проявлений заболевания в остром периоде выявлена различная частота симптомов поражения нервной, сердечно-сосудистой систем, суставов (табл. 1). Преобладали жалобы на лихорадку, слабость, недомогание, плохой сон, раздражительность, головную боль, головокружение. При врачебном осмотре пациентов, перенесших ИКБ в течение предшествующих 12–24 месяцев, у двоих выявлены симптомы суставного синдрома, у одной пациентки регистрировалась неврологическая симптоматика. Некоторые пациенты предъявляли жалобы со стороны сердечно-сосудистой системы в виде более давящего и сжимающего характера в области сердца, сердцебие-

ние, ощущение перебоев. Учитывая наличие у них сопутствующей патологии (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь) и отсутствие антител к боррелиям, мы не связывали данные симптомы с ИКБ. Рецидивов мигрирующих эритем, признаков развития хронического атрофического акродерматита и склеродермии не выявлено. Изменений в периферической крови не отмечено, все показатели находились в пределах физиологической нормы.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов (в остром периоде), перенесших иксодовый клещевой боррелиоз

Table 1. Clinical characteristics of patients (in acute period) who underwent ixodid tick-borne borreliosis

Синдромы/симптомы Syndromes/symptoms	Частота выявления клинических и лабораторных признаков, % Frequency of detection of clinical and laboratory signs, %
Лихорадка: фебрильная/субфебрильная Fever: febrile/subfebrile	41,6
Интоксикационный синдром (слабость, недомогание, плохой сон, раздражительность) Intoxication syndrome (weakness, malaise, poor sleep, irritability)	41,6
Головная боль/головокружение Headache/dizziness	41,6
Чувство тяжести, тупые боли в правом подреберье Feeling of heaviness, dull pain in the right hypochondrium	16,7
Увеличение печени Liver enlargement	16,7
Тошнота/рвота Nausea/vomiting	8,3
Артралгии, миалгии Arthralgia, myalgia	25
Эритема на коже Erythema on the skin	100
Катаральный синдром Catarrhal syndrome	16,7
Выявление специфических антител Identification of specific antibodies	41,6
Отрицательный результат ИФА диагностики Negative result of ELISA diagnostics	58,4

Биохимические показатели также соответствовали норме. Специфические антитела выявлялись в 41,6% случаев.

Известно, что иммуноглобулины класса М появляются в крови пациента уже через неделю (чаще через 14 дней) после момента заражения, IgG — в среднем через 20–30 дней. По мере развития инфекции спектр основных антител меняется, однако их общий титр остается высоким, что позволяет с высокой надежностью установить наличие заболевания через месяцы и даже годы после укуса. Наше исследование показало, что антитела к боррелиям сохраняются более чем у половины пациентов спустя 12–24 месяцев после острого периода даже при клиническом выздоровлении. У 35% пациентов с выздоровлением после перенесенного острого ИКБ выявлялись специфические IgM-антитела к боррелиям. У части пациентов титр антител снижался по отношению к таковым в остром периоде, у некоторых регистрировалось повышение уровня IgM-антител. IgG-антитела к боррелиям были выявлены у шести пациентов.

Неопределенность симптоматики и разноречивость данных ПЦР-диагностики побудила нас проанализировать результаты иммунологического обследования пациентов с ИКБ в анамнезе через 12–24 месяцев от начала заболевания. В зависимости от наличия иммуноглобулинов класса М и класса G к *B. burgdorferi* в сыворотке крови пациентов, перенесших боррелиоз, объединили в следующие группы: IgM–IgG– реконвалесценты (11 пациентов), IgM+IgG– реконвалесценты (7 пациентов), IgM–IgG+ реконвалесценты (6 пациентов).

Мы провели анализ показателей клеточного и гуморального иммунитета у пациентов, перенесших ИКБ (включая уровень экспрессии активационных антигенов), в зависимости от наличия иммуноглобулинов класса М и класса G к *B. burgdorferi* в сыворотке крови.

Исследовали субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови — относительное количество и абсолютное содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (NK), CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (NKT), CD19⁺ лимфоцитов. Полученные данные анализировали с учетом нормальных иммунологических параметров здоровых доноров. Норму определяли как интервал исследуемого признака, включающего по одному и двум среднему квадратическому отклонению от среднего значения (M±1SD, M±2SD), при ненормальном распределении — как интервал значений между установленными произвольно нижними и верхними процентами общего диапазона Me (25–75%), Me (5–95%) (табл. 2, 3). Узкий нормативный диапазон соответствовал значениям, не выходящим за пределы одного стандартного отклонения от средне-

го значения, широкий нормативный диапазон соответствовал значениям двух стандартных отклонений. Все показатели, входящие в эти пределы являлись нормальными.

В результате проведенных исследований было установлено, что в усредненной выборке (все пациенты, перенесшие ИКБ) общее количество лейкоцитов периферической крови было значимо ниже показателей в группе здоровых доноров (5280 ± 1204 и 6002 ± 876 кл/мкл, $p < 0,05$, соответственно). Выявлено снижение относительного содержания и абсолютного количества лимфоцитов у реконвалесцентов ИКБ по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц (табл. 2). Показатели, характеризующие структуру основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови в усредненной выборке (все пациенты), находились в границах значений, констатирующих удовлетворительную функцию иммунной сис-

темы, хотя средние значения относительного содержания и абсолютного количества $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов отличались от таковых у здоровых доноров (табл. 3). Иммунорегуляторный индекс (ИРИ), характеризующий напряженность Т-клеточного иммунитета пациентов, перенесших ИКБ ($1,8 \pm 0,6$), значимо не отличался от такового у здоровых доноров ($1,8 \pm 0,2$, $p > 0,05$). Вместе с тем отмечено увеличение относительного содержания клеток с цитотоксическим потенциалом — НК-клеток ($18,6 \pm 4,6\%$), НКТ-клеток ($6,9 \pm 3,8\%$, $p < 0,05$).

Анализируя показатели иммунного статуса у IgM^+ реконвалесцентов, некоторые исследователи связывают длительно сохраняющийся уровень специфических IgM с поражением функции Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$ лимфоцитов), необходимых для переключения продукции IgM на IgG , а также снижением общего количе-

Таблица 2. Показатели клеточного иммунитета у пациентов, перенесших иксодовый клещевой боррелиоз

Table 2. Index of cellular immunity in patients who underwent tick-borne borreliosis

Показатель Indices	Группа К Здоровые доноры Group K Healthy donors			Все пациенты All patients	Группа $IgG-IgM-$ Group $IgG-IgM-$	Группа $IgM-IgG-$ Group $IgM-IgG-$	Группа $IgM-IgG+$ Group $IgM-IgG+$
	$M \pm 1SD$	$M \pm 2SD$	$M \pm \Sigma$				
Лейкоциты, кл/мкл Leukocytes, cells/ μ l	5200–7100	4130–8000	6002 \pm 876	5280 \pm 1204*	5290 \pm 1327*	4907 \pm 1075*	5430 \pm 1551
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	30–36	28–40	31,0 \pm 6,2	28,4 \pm 4,8	28,2 \pm 5,0	34,5 \pm 3,8	33,8 \pm 5,2
Лимфоциты, кл/мкл Lymphocytes, cells/ μ l	1833–2527	1486–2874	1860 \pm 372	1478 \pm 237	1491 \pm 264	1692 \pm 400	1835 \pm 282
$CD3^+$, %	67,9–78,7	62,5–84,1	73,3 \pm 5,4	63,5 \pm 7,2	64,3 \pm 5,4	66,2 \pm 6,4	55,0 \pm 3,6*
$CD3^+$, кл/мкл $CD3^+$, cells/ μ l	1479–1715	1361–1833	1400 \pm 101	938 \pm 106*	958 \pm 80	1116 \pm 186	1009 \pm 66*
$CD3^+CD4^+$, %	42,0–50,2	37,9–54,3	46,1 \pm 4,1	37,0 \pm 6,0*	38,8 \pm 5,3	35,7 \pm 4,2*	38,3 \pm 2,3
$CD3^+CD4^+$, кл/мкл $CD3^+CD4^+$, cells/ μ l	984–1160	896–1248	902 \pm 212	546 \pm 88*	578 \pm 79	604 \pm 71*	702 \pm 42
$CD3^+CD8^+$, %	21,1–31,3	16,0–36,4	25,9 \pm 5,5	22,8 \pm 4,1*	23,5 \pm 5,3	30,8 \pm 6,3*	17,3 \pm 4,2*
$CD3^+CD8^+$, кл/мкл $CD3^+CD8^+$, cells/ μ l	464–688	352–700	481 \pm 123	336 \pm 60*	350 \pm 79	604 \pm 106*	317 \pm 77*
ИРИ ($CD4^+/CD8^+$) IRI ($CD4^+/CD8^+$)	1,6–2,0	1,4–2,2	1,8 \pm 0,2	1,8 \pm 0,6	1,7 \pm 0,4	1,2 \pm 0,5	2,2 \pm 0,3*
$CD19^+$, %	10,2–15,2	7,7–17,7	12,6 \pm 3,2	16,5 \pm 4,2	13,8 \pm 4,5	12,6 \pm 3,3	14,6 \pm 4,1
$CD19^+$, кл/мкл	224–334	169–389	230 \pm 54	243 \pm 62	205 \pm 67	213 \pm 55	267 \pm 75
$CD3-CD16^+CD56^+$, %	7,5–15,3	4,6–16,2	10,4 \pm 4,8	18,6 \pm 4,6*	18,5 \pm 5,6	20,6 \pm 7,9*	26,6 \pm 5,3*
$CD3-D16^+CD56^+$, кл/мкл	164–292	100–356	193 \pm 89	274 \pm 68*	275 \pm 46	348 \pm 133*	488 \pm 97*
$CD3^+CD16^+CD56^+$, %	1,30–4,40	0,50–7,30	3,2 \pm 1,7	6,9 \pm 3,8*	8,2 \pm 3,9	8,3 \pm 2,1*	2,9 \pm 1,3*

Примечание. Здесь и в таблице 3: * $p < 0,05$ — значимость различий (по сравнению с показателями в группе здоровых доноров).

Note. Here and in Table 3: * $p < 0,05$ — the significance of differences (compared to the indicators in the group of healthy donors).

Таблица 3. Уровень экспрессии активационных антигенов на лимфоцитах периферической крови пациентов перенесших иксодовый клещевой боррелиоз

Table 3. Level of expression of activation antigens on peripheral blood lymphocytes in patients who underwent tick-borne borreliosis

Показатель Indices	Группа К Здоровые доноры Group K Healthy donors			Все пациенты All patients	Группа IgM–IgG– Group IgM–IgG–	Группа IgM+IgG– через 1–2 года Group IgM+IgG– after 1–2 years	Группа IgM–IgG+ Group IgM–IgG+
	M±1SD	M±2SD	M±Σ				
Лимфоциты, кл/мкл Лимфоциты, cells/μl	1833– 2527	1486– 2874	1860±372	1478±237	1491±264	1692±400	1835±282
CD25 ⁺ , %	6,2–10	8,8–15,4	8,2±2,1	12,7±2,2*	12,3±2,4	11,1±2,4	14,3±2,5
CD25 ⁺ , кл/мкл CD25 ⁺ , cells/μl	113–256	127–431	147±43	187±33*	183±35*	187±40*	262±45*
CD95 ⁺ , %	16,4–26	11,6–30,8	20,4±7,1	29,3±4,9*	29,5±5,0	27,2±4,0	29,6±3,2
CD95 ⁺ , кл/мкл CD95 ⁺ , cells/μl	363–573	258–678	379±132	433±72*	439±74*	460±66*	543±58*
HLA-DR ⁺ , %	12,5–19,5	9–23	15,5±4,0	14,5±3,8	14,8±3,8	14,0±2,8	20,0±4,2
HLA-DR+CD3 ⁺ , кл/мкл HLA-DR+CD3 ⁺ , cells/μl	38–112	0–149	63±33	214±56*	220±56*	236±47*	367±77*

ства Т-лимфоцитов и клеток-супрессоров, что позже может привести к повреждению тканей из-за аутоиммунных реакций или усиленного ответа на боррелии [5, 12].

В нашем исследовании присутствие IgM антител в сыворотке крови пациентов, перенесших боррелиоз, было также сопряжено со значительным снижением относительного содержания и абсолютного количества CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на фоне уменьшения общего количества лейкоцитов по сравнению с показателями у здоровых людей. Вместе с тем у пациентов, в крови которых сохранялись IgM-антитела, регистрировалось повышенное содержание NKT, НК-клеток, CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов (табл. 2). Мы полагаем, что снижение численности CD4⁺ субпопуляции лимфоцитов у реконвалесцентов ИКБ, демонстрирует недостаточный Т-клеточный пролиферативный ответ на антигены боррелий, а увеличение цитотоксического потенциала иммунной системы может отражать повышенный уровень бактериальной нагрузки IgM⁺ у пациентов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные исследований [9], показавшие способность мышиных и человеческих NKT-клеток распознавать гликолипиды, в частности диацилглицерин *B. burgdorferi*. Эти данные указывают на то, что ответы NKT-клеток, управляемые опосредованным Т-клеточным рецептором распознаванием гликолипидов, могут быть связаны с обеспечением защиты от *B. burgdorferi*.

У части пациентов на поздних сроках заболевания выявлялись специфические IgG антитела при отсутствии IgM. У них регистрировались наиболее низкие значения от-

носительного содержания CD3⁺ лимфоцитов (55,0±3,6%), CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов (17,3±4,2%), NKT-клеток (2,9±1,3%) по сравнению с показателями в целой выборке, а также у IgM–IgG– и у IgM+IgG– реконвалесцентов. В то же время у IgG⁺ пациентов регистрировались более высокие значения относительного содержания NK-клеток (26,6±5,3%). Иммунорегуляторный индекс (2,2±0,3), характеризующий напряженность Т-клеточного иммунитета, значимо превышал таковой у IgM–IgG– и у IgM+IgG– пациентов (табл. 2).

Активационная модуляция иммунокомпетентных клеток, обусловленная воздействием различных (в том числе инфекционных) агентов, характеризуется изменением репертуара поверхностных молекул, последовательно отражающих происходящие в клетке процессы активации, пролиферации, дифференцировки, апоптоза, что позволяет оценить их вклад в формирование патологического процесса.

У всех реконвалесцентов ИКБ были выявлены признаки хронической Т-клеточной активации (в большей степени выраженной у IgG⁺ пациентов, перенесших ИКБ), сопряженной с увеличением количества циркулирующих Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные антигены — рецептор к интерлейкину-2 (CD25), апоптотический маркер CD95/Fas (табл. 3). Экспрессия HLA-DR (поздний активационный антиген) была повышена у IgG⁺ пациентов. Выраженное снижение относительного содержания и абсолютного количества CD3⁺CD8⁺ Т-клеток у IgG⁺ пациентов (по сравнению с показателями у здоровых до-

норов) на фоне увеличения длительной активации лимфоцитов может являться настораживающим фактором в отношении склонности к сильному гуморальному ответу, образованию аутоантител к собственным тканям и развитию аутоиммунных реакций [7].

Дополнительным фактором риска может являться низкий уровень НКТ-клеток, участвующих в контроле иммунных реакций. На моделях аутоиммунных заболеваний мышей показано, в частности, что дефицит НКТ обостряет течение заболевания, и наоборот, специфическая активация НКТ-клеток гликолипидными антигенами защищает мышей от развития аутоиммунных реакций [13].

В группе серонегативных пациентов (IgM–IgG– пациенты), несмотря на отсутствие специфических антител, клеточный иммунный ответ характеризовался снижением относительного содержания и абсолютного количества CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов и увеличением НК- и НКТ-клеток.

Таким образом, в результате комплексной оценки функционального состояния показате-

лей клеточного иммунитета у пациентов с ИКБ в анамнезе установлена вариабельность степени активации лимфоцитов периферической крови, свидетельствующая о наличии индивидуальности реакции иммунной системы.

Дисбаланс клеточного иммунного ответа, регистрируемый у серонегативных пациентов, перенесших ИКБ, может быть косвенным свидетельством продолжающегося инфицирования боррелиями.

Наличие в сыворотке крови специфических IgG- и IgM-антител в отдаленные сроки после клинического выздоровления, регистрируемое на фоне дисбаланса иммунной системы, является настораживающим фактором в отношении склонности к развитию аутоиммунных реакций.

К маркерным показателям возможной хронизации боррелиоза на поздних сроках заболевания может быть отнесено сочетание обнаруженных специфических IgM-антител с увеличением цитотоксического потенциала иммунной системы, а также IgG-антител, сопряженное со снижением содержания супрессорных и цитотоксических клеток.

Список литературы/References

1. Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Жукова О.Б., Чечина О.Е. Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза // Бюллетень сибирской медицины. 2010. Т. 9, № 1. С. 21–25. [Baraulina A.S., Kologrivova Ye.N., Zhukova O.B., Chechina O.Ye. Characteristics of production cytokines in patients with development of chronic tick-borne borreliosis. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 21–25. (In Russ.)]
2. Лукашова Л.В., Карпова М.Р., Лепехин А.В., Пирогова Н.П., Жукова Н.Г., Киюцина Т.А., Добкина М.Н. Иксодовые клещевые боррелиозы // Бюллетень сибирской медицины. 2006. Т. 5, № 1. С. 59–66. [Loukashova L.V., Karpova M.R., Lepyokhin A.V., Pirogova N.P., Zhoukova N.G., Kiyutsina T.A., Dobkina M.N. Ixodes tick-borne borrelioses. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2006, vol. 5, no. 1, pp. 59–66. (In Russ.)]
3. Миноранская Н.С. Патогенетические и иммунологические особенности течения иксодовых клещевых боррелиозов // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2007. Т. 68, № 1. С. 5–9. [Minoranskaya N.S. Pathogenetic and immunologic peculiarities of ixodid tick-borne borreliosis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2007, vol. 68, no. 1, pp. 5–9. (In Russ.)]
4. Мошкова Д.Ю., Авдеева М.Г. Клинико-иммунологические особенности воспалительного процесса при клещевом боррелиозе // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016. Т. 21, № 2. С. 86–92. [Moshkova D.Yu., Avdeeva M.G. Clinical and immunological features of inflammation in Lyme borreliosis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2016, vol. 21, no. 2, pp. 86–92. doi: 10.18821/1560-9529-2016-21-2-86-92 (In Russ.)]
5. Berardi V.P., Weeks K.E., Steere A.C. Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme immunoassay. *J. Infect. Dis.*, 1988, vol. 158, no. 4, pp. 754–760.
6. Brunner M., Sigal L.H. Use of serum immune complexes in a new test that accurately confirms early Lyme disease and active infection with *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, no. 9, pp. 3213–3221. doi: 10.1128/JCM.39.9.3213-3221.2001
7. Dattwyler R.J., Thomas J.A., Benach J.L., Golightly M.G. Cellular immune response in Lyme disease: the response to mitogens, live *Borrelia burgdorferi*, NK cell function and lymphocyte subsets. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A.*, 1986, vol. 263, no. 1–2, pp. 151–159.
8. Jarefors S., Janefjord C.K., Forsberg P., Jenmalm M.C., Ekerfelt C. Decreased up-regulation of the interleukin-12Rβ2-chain and interferon-γ secretion and increased number of forkhead box P3-expressing cells in patients with a history of chronic Lyme borreliosis compared with asymptomatic *Borrelia*-exposed individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, vol. 147, no. 1, pp. 18–27. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03245.x
9. Kinjo Y., Tupin E., Wu D., Fujio M., Garcia-Navarro R., Benhnia M.R., Zajonc D.M., Ben-Menachem G., Ainge G.D., Painter G.F., Khurana A., Hoebe K., Behar S.M., Beutler B., Wilson I.A., Tsuji M., Sellati T.J., Wong C.H., Kronenberg M. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat. Immunol.*, 2006, vol. 7, no. 9, pp. 978–986. doi: 10.1038/ni1380
10. Lantos P.M. Chronic Lyme disease // *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 325–340. doi: 10.1016/j.idc.2015.02.006
11. Lopez-Vergès S., Milush J.M., Pandey S., York V.A., Arakawa-Hoyt J., Pircher H., Norris P.J., Nixon D.F., Lanier L. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16⁺ NK-cell subset. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 19, pp. 3865–3874. doi: 10.1182/blood-2010-04-282301

12. Moffat C.M., Sigal L.H., Steere A.C., Freeman D.H., Dwyer J.M. Cellular immune findings in Lyme disease correlation with serum IgM and disease activity. *Am. J. Med.*, 1984, vol. 77, no. 4, pp. 625–632. doi: 10.1016/0002-9343(84)90352-8
13. Sigal L.H. Immunologic mechanisms in Lyme neuroborreliosis: the potential role of autoimmunity and antigen mimicry. *Semin. Neurol.*, 1997, vol. 17, no. 1, pp. 63–68. doi: 10.1055/s-2008-1040915
14. Wu L., Van K.L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr. Mol. Med.*, 2009, vol. 9, no. 1, pp. 4–14. doi: 10.2174/156652409787314534

Авторы:

Запорожец Т.С., д.м.н., старший научный сотрудник, зам. директора по научной работе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;
Сокотун С.А., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского института, г. Владивосток, Россия;
Симакова А.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского института, г. Владивосток, Россия;
Персиянова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия; зав. лабораторией инновационных медико-биологических исследований и технологий Медицинского объединения ДВО РАН, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Zaporozhets T.S., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Deputy Director for the Science, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;
Sokotun S.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Simakova A.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Persyanova E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation; Head of Laboratory of Innovative Medical and Biological Research and Technologies of the Medical Department of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.05.2018
Отправлена на доработку 12.09.2019
Принята к печати 27.09.2019

Received 23.05.2018
Revision received 12.09.2019
Accepted 27.09.2019

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИНТРАТЕКАЛЬНОГО СИНТЕЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРОТИВ НЕЙРОТРОПНЫХ ВИРУСОВ (MRZ-РЕАКЦИЯ) В ДИАГНОСТИКЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

А.Н. Мошникова¹, В.К. Максимчук¹, С.В. Лапин¹, В.Д. Назаров¹, Е.А. Суркова¹,
С.А. Новиков¹, Г.С. Макшаков², И.Ю. Крутецкая³, В.С. Краснов¹, Я.Б. Кушнир¹,
Н.А. Неофидов^{1,2}, Н.А. Тотолян¹, А.А. Скоромец¹, Е.П. Евдошенко^{1,2},
Арег А. Тотолян^{1,4}

¹ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Городской центр по лечению рассеянного склероза и аутоиммунных заболеваний, Санкт-Петербург, Россия

³ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Рассеянный склероз — хроническое демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы с гетерогенными проявлениями, характеризующееся аутоиммунным воспалением и прогрессированием нейродегенерации. Одной из особенностей аутоиммунного воспаления при рассеянном склерозе является полиспецифический интратекальный гуморальный иммунный ответ против нейротропных вирусов (кори, краснухи и ветряной оспы) — MRZ-реакция. В ее основе лежит поликлональная активация зрелых В-лимфоцитов в центральной нервной системе с интратекальным синтезом антител к анamnестическим антигенам, что не связано с репликацией вирусов в центральной нервной системе и синтезом антител в крови. Иммуноглобулины, продуцируемые против нейротропных вирусов, являются составной частью олигоклонального пула антител в цереброспинальной жидкости. Поскольку иммуноглобулины способны проникать через гематоэнцефалический барьер, для определения их интратекального синтеза рассчитывают индексы, учитывающие не только концентрации антител в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости, но и проницаемость гематоэнцефалического барьера для данных антител [К (альбумин), К (IgG)]. Цель исследования состояла в оценке информативности определения показателей интратекального синтеза антител против нейротропных вирусов (MRZ-реакции) при рассеянном склерозе. В исследование включены 60 пациентов: первая группа — 35 больных рассеянным склерозом, вторая — 25 пациентов с различными воспалительными и невоспалительными заболеваниями центральной нервной системы. У всех пациентов в парных образцах

Адрес для переписки:

Мошникова Анна Николаевна
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8,
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ имени акад. И.П. Павлова МЗ РФ.
Тел.: 8 (812) 499-71-94 (служебн.).
E-mail: moshnikova-anna@mail.ru

Contacts:

Anna N. Moshnikova
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str., 6/8,
Pavlov First State Medical University.
Phone: +7 (812) 499-71-94 (office).
E-mail: moshnikova-anna@mail.ru

Библиографическое описание:

Мошникова А.Н., Максимчук В.К., Лапин С.В., Назаров В.Д.,
Суркова Е.А., Новиков С.А., Макшаков Г.С., Крутецкая И.Ю.,
Краснов В.С., Кушнир Я.Б., Неофидов Н.А., Тотолян Н.А.,
Скоромец А.А., Евдошенко Е.П., Тотолян Арег А. Диагностическая
значимость интратекального синтеза иммуноглобулинов против
нейротропных вирусов (MRZ-реакция) в диагностике рассеянного
склероза // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 703–712.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-703-712

Citation:

Moshnikova A.N., Maksimchuk V.K., Lapin S.V., Nazarov V.D., Surkova E.A.,
Novikov S.A., Makshakov G.S., Krutetskaya I.Yu., Krasnov V.S., Kushnir Ya.B.,
Neofidov N.A., Totolian N.A., Skoromets A.A., Evdoshenko E.P.,
Totolian Areg A. Diagnostic significance of intrathecally synthesized
immunoglobulins against neurotropic viruses (MRZ-reaction) in diagnosis
of multiple sclerosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 703–712. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-5-6-703-712

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (соглашение № 16-15-00118).

цереброспинальной жидкости и сыворотки определяли следующие показатели: олигоклональный IgG, свободные легкие цепи иммуноглобулинов каппа и лямбда, индекс IgG и индексы специфических антител с последующей оценкой выраженности MRZ-реакции. Результаты показали, что MRZ-реакция является наиболее специфичным тестом для диагностики рассеянного склероза. У 3 из 35 пациентов группы с рассеянным склерозом с отсутствием олигоклонального IgG был выявлен интратекальный синтез антител к нейротропным вирусам. Кроме того, у больных рассеянным склерозом выявлена взаимосвязь MRZ-реакции со степенью инвалидизации по шкале EDSS: у пациентов с наиболее высокими показателями EDSS присутствует интратекальный синтез антител к трем вирусным агентам, а наиболее низкие показатели EDSS были у MRZ-негативных пациентов. Определение MRZ-реакции представляется целесообразным для подтверждения диагноза рассеянного склероза при отрицательных результатах других лабораторных тестов (олигоклональных иммуноглобулинов и свободных легких цепей иммуноглобулинов каппа/лямбда в цереброспинальной жидкости) и позволяет повысить точность диагностики и оценки тяжести течения рассеянного склероза.

Ключевые слова: рассеянный склероз, MRZ-реакция, интратекальный синтез иммуноглобулинов, свободные легкие цепи иммуноглобулинов, олигоклональный IgG, индексы антител.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INTRATHECALLY SYNTHESIZED IMMUNOGLOBULINS AGAINST NEUROTROPIC VIRUSES (MRZ-REACTION) IN DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Moshnikova A.N.^a, Maksimchuk V.K.^a, Lapin S.V.^a, Nazarov V.D.^a, Surkova E.A.^a, Novikov S.A.^a, Makshakov G.S.^b, Krutetskaya I.Yu.^c, Krasnov V.S.^a, Kushnir Ya.B.^a, Neofidov N.A.^{a,b}, Totolian N.A.^a, Skoromets A.A.^a, Evdoshenko E.P.^{a,b}, Totolian Areg A.^{a,d}

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

^b City Center for Multiple Sclerosis and Autoimmune Diseases Treatment, St. Petersburg, Russian Federation

^c A.M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Multiple sclerosis is chronic demyelinating disease of the central nervous system with autoimmune inflammation and accretive neurodegeneration. One of the characteristics of autoimmune inflammation in multiple sclerosis is a polyspecific intrathecal humoral immune response against neurotropic viruses (Measles, Rubella and varicella Zoster) called MRZ-reaction. This immune response is based on polyclonal activation of mature B lymphocytes in the central nervous system and intrathecal synthesis of antibodies to anamnestic antigens unrelated to viral replication in the central nervous system as well as serum antibody release. Immunoglobulins produced against neurotropic viruses are an integral part of the oligoclonal antibody pool in the cerebrospinal fluid. Because immunoglobulins can penetrate the blood brain barrier, not only serum and cerebrospinal fluid specific antibody indices are calculated, but also blood-brain barrier antibody permeability (Qalbumin, QIgG) are taken into account to assess their intrathecal synthesis. The aim of the study was to assess the informative value of the intrathecal antibodies against neurotropic viruses (MRZ-reaction) in multiple sclerosis. There were enrolled 60 patients divided into 2 groups: group 1 — 35 patients diagnosed with multiple sclerosis, group 2 — 25 patients with inflammatory and non-inflammatory disorders of the central nervous system. Paired cerebrospinal fluid and serum samples were collected from all patients to measure level of oligoclonal IgG, immunoglobulin free kappa and lambda light chains, IgG index and specific antibodies indices, followed by assessing magnitude of MRZ-reaction. We found that the MRZ-reaction was the most specific test to diagnose multiple sclerosis. Intrathecally produced antibodies against neurotropic viruses were detected in 3 of 35 multiple sclerosis patients with lacking oligoclonal IgG antibodies. In addition, a relationship between MRZ-reaction and degree of EDSS disability was found in MS patients: peak EDSS score was reported in patients with intrathecally synthesized antibodies against 3 viral agents, whereas the minimum EDSS score — among MRZ-negative patients. Thus, assessing MRZ-reaction seems rational for confirming MS diagnosis in case of other negative laboratory tests (oligoclonal immunoglobulins and free kappa/lambda light chains in cerebrospinal fluid) allowing to improve diagnostic accuracy and evaluation of MS severity.

Key words: multiple sclerosis, MRZ-reaction, intrathecal synthesis of immunoglobulins, free light chains of immunoglobulins, oligoclonal IgG, antibody indices.

Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с воспалительной демиелинизацией и прогрессирующей нейродегенерацией. Рассеянный склероз является одной из наиболее социально значимых

неврологических проблем в связи с высокой распространенностью у молодого работоспособного населения и развитием необратимой инвалидизации [8].

Поражение головного и спинного мозга при РС характеризуется иммуноопосредованным процессом демиелинизации, активацией микро-

глии, повреждением аксонов и пролиферацией астроцитов с исходом в глиоз [23, 25]. Для подтверждения диагноза РС клинично-инструментальные исследования могут быть дополнены лабораторными методами диагностики [4, 8, 34]. Основным лабораторным маркером, наблюдающимся при РС, является повышение уровня интратекальной продукции иммуноглобулинов [5].

Помимо этого, для РС характерно изменение клональности интратекального В-клеточного иммунного ответа (появление олигоклонального IgG), увеличение концентрации свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов, а также феномен полиспецифического интратекального иммунного ответа [1, 2, 13].

Полиспецифический интратекальный гуморальный иммунный ответ против нейротропных вирусов (вируса кори (Measles), краснухи (Rubella) и ветряной оспы (Varicella-Zoster) впервые был описан в 1992 г. Felgenhauer. Интратекальные специфические антитела при РС синтезируются также ко многим другим возбудителям, таким как *Herpes simplex virus* (25%), *Borrelia species* (25%), *Chlamydia species* (30%), *Toxoplasma gondii* (10%) [29]. Особенностью этого иммунного ответа является поликлональная активация зрелых В-лимфоцитов в ЦНС и интратекальный синтез антител к анамнестическим антигенам. Феномен получил название MRZ-реакции (MRZR). Сообщалось, что MRZR является наиболее диагностически значимым маркером РС, специфичность которого, по некоторым данным, составляет более 95% [30].

Следует отметить, что синтез MRZ-антител не связан с интратекальной репликацией самих вирусов, что неоднократно подтверждалось отрицательными данными полимеразной цепной реакции (ПЦР) ЦСЖ пациентов с РС. Иммуноглобулины, продуцируемые против нейротропных вирусов, входят в состав олигоклонального пула IgG (ОП-IgG) в цереброспинальной жидкости и составляют лишь 2% от общего содержания IgG в ЦСЖ. Интратекальный иммунный ответ против нейротропных вирусов является анамнестическим, так как имеется связь между уровнем иммунизации в популяции к конкретному возбудителю и количеством положительных результатов интратекального синтеза антител при РС к данному инфекционному агенту [28]. Показано, что повышение интратекальной фракции иммуноглобулинов против вируса краснухи среди пациентов с РС достоверно чаще встречается в немецкой популяции, чем среди жителей Кубы. В то же время, в кубинской популяции на частоту положительного результата влиял пол исследуемых пациентов: среди женщин интратекальный иммунный ответ обнаруживался в большем проценте случаев. Эти результаты объясняются более низкой за-

болеваемостью краснухой на Кубе и иммунизацией женской популяции [31]. По мере прогрессирования заболевания происходит нарастание титра антител к анамнестическим антигенам, что указывает на вовлечение в аутоиммунный процесс новых плазмочитов, образованных из активированных В-клеток памяти, длительно персистирующих в эктопических фолликулах ЦНС [10, 29]. В ряде исследований показано, что по мере прогрессирования РС увеличивается доля пациентов с интратекальным синтезом антител против кори вне зависимости от проводившейся терапии [16].

Для оценки интратекального синтеза специфических антител к вирусам кори, краснухи и ветряной оспы производится расчет коэффициента альбумина [К (альбумин)] и коэффициента общего IgG [К (IgG)], которые являются показателями функционального состояния гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В качестве интегрального показателя интратекального синтеза специфических антител рассчитывается соответствующий индекс (ИА). Интратекальный синтез специфических антител считается достоверным при индексе, равном и превосходящем 1,5 (ИА \geq 1,5). MRZR расценивается как положительная при обнаружении интратекального синтеза специфических антител против двух (MRZR-2) или трех (MRZR-3) исследуемых вирусных агентов [14]. Все пациенты с MRZR-1 всегда нуждаются в количественной оценке интратекально-синтезированных специфических антител, так как в данном случае не исключена возможность инфекционной моноспецифической природы заболевания. Следует подчеркнуть, что при хроническом воспалительном процессе в ЦНС, каким является РС, специфическая фракция иммуноглобулинов в ЦСЖ, обусловленная полиспецифическим интратекальным гуморальным ответом, будет значительно меньше (в 20–60 раз), чем при острой специфической (инфекционной) воспалительной реакции. Так, фракция специфических антител против вируса ветряной оспы при РС в среднем составляет 1,3% от общего содержания интратекально синтезированного IgG, а при неврологических поражениях, вызванных реактивацией данного вируса, достигает 45,1% [12, 18, 24]. В ряде исследований имеются указания на интратекальный синтез специфических антител у пациентов с хроническими инфекционными и воспалительными неинфекционными заболеваниями ЦНС, что свидетельствует о связи этого феномена с хроническим воспалением [9].

Целью настоящей работы было определение диагностической значимости MRZR у пациентов с РС, а также определение значимости комплексной оценки MRZR и других лабораторных тестов при РС.

Материалы и методы

В исследование было включено 60 пациентов, наблюдавшихся в Санкт-Петербургском Городском центре рассеянного склероза и клинике неврологии ПСПбГМУ. Пациенты были разделены на 2 группы. Основными критериями включения в первую группу ($n = 35$) были: установленный диагноз РС на основании критериев МакДоналда 2010 г., возраст старше 18 лет, наличие очагов демиелинизации на МРТ головного мозга. Критериями исключения из исследования явилось наличие у пациентов первично-прогрессирующей и вторично-прогрессирующей форм РС. Во вторую группу (группа сравнения) вошли пациенты с другими воспалительными и невоспалительными заболеваниями нервной системы ($n = 25$): боковой амиотрофический склероз ($n = 3$), васкулопатия неуточненная ($n = 4$), изолированный церебральный васкулит ($n = 2$), спастическая параплегия Штрюмпеля ($n = 1$), острая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия ($n = 4$), синдром Susac ($n = 1$), нейроборрелиоз ($n = 3$), синдром Шегрена ($n = 1$), амилоидная полинейропатия ($n = 1$), наследственная спиноцеребеллярная атаксия ($n = 1$), медуллобластома правого полушария мозжечка ($n = 1$), AQP4-серонегативный оптиконейромиелит, ($n = 1$), церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL) ($n = 2$). В группу № 1 (РС) вошли 23 женщины (66%) и 12 мужчин (34%). У пациентов учитывались следующие клинические данные: длительность РС; длительность заболевания на момент сбора образцов ЦСЖ и сыворотки крови; вариант первых клинических проявлений — клинически изолированного синдрома (КИС); показатели инвалидизации по шкале EDSS на момент включения в исследование; время до достижения EDSS 3.0 и 4.0; количество обострений за первый год болезни и за первые 5 лет; длительность первой клинической ремиссии [22]. Также оценивали количество очагов, накапливающих контрастное вещество, по данным последнего МРТ-исследования головного мозга. У пациентов обеих групп были определены следующие показатели в парных образцах ЦСЖ и сыворотки крови: концентрация СЛЦ-Ig каппа и лямбда, альбумина, IgG и специфические IgG против вирусов кори, краснухи и ветряной оспы, наличие ОП-IgG.

Анализ парных образцов ЦСЖ и сыворотки позволяет оценить функциональное состояние ГЭБ и влияние сывороточной концентрации исследуемого маркера на интратекстальную фракцию [26].

Определение концентрации альбумина в сыворотке крови (спектрофотометрический тест с бромкрезоловым зеленым) и в ЦСЖ (турбидиметрический тест в реакции латекс-агглютинации), а также общего IgG (турбидиметрический тест в реакции преципитации) в сыворотке крови производилось на биохимическом анализаторе «А-15» (Random Access) с использованием диагностических наборов для определения альбумина/микроальбумина и общего IgG (BioSystems, Испания). Для определения концентрации общего IgG в ЦСЖ, СЛЦ-Ig каппа и лямбда в сыворотке и ЦСЖ применялись диагностические наборы для иммуноферментного анализа (Полигност, Россия).

Определение ОП-IgG проводилось по стандартной методике изоэлектрофокусирования в сочетании с иммуноблоттингом (Helena Biosciences, Великобритания).

Для определения специфических антител класса IgG против вирусов краснухи, кори и вируса ветряной оспы применялись соответствующие диагностические наборы для иммуноферментного анализа (Euroimmun, Германия): Anti-Rubella Virus ELISA (IgG), Anti-Measles Virus ELISA (IgG), Anti-Varicella Zoster Virus (VZV) ELISA (IgG).

Для учета MRZR были рассчитаны: коэффициент альбумина [К (альбумин)], коэффициент общего IgG [К (IgG)] и индексы специфических антител (ИА) [30]. Коэффициент альбумина и общего IgG определялись по следующим формулам:

$$K(\text{альбумин}) = \frac{\text{Концентрация альбумина (ЦСЖ)}}{\text{Концентрация альбумина (сыворотка)}};$$

$$K(\text{IgG}) = \frac{\text{Концентрация IgG (ЦСЖ)}}{\text{Концентрация IgG (сыворотка)}}.$$

Расчет индекса специфических антител к вирусу кори, краснухи или вирусу ветряной оспы, при отсутствии значимого интратекстального синтеза IgG, представляет отношение коэффициента специфической фракции IgG [К (IgG_{спец.})] к коэффициенту концентрации общего его количества. При наличии значимого интратекстального синтеза IgG расчет осуществлялся через отношение коэффициента специфической фракции IgG к значению предельной сывороточной фракции IgG, поступившего в ЦСЖ через ГЭБ [К (предельное)]:

$$\text{ИА} = \frac{K(\text{IgG}_{\text{спец.}})}{K(\text{IgG})}, \text{ при } K(\text{IgG}) < K(\text{альбумин});$$

$$ИА = \frac{K(IgG_{\text{спец.}})}{K(\text{предельное})}, \text{ при } K(IgG) > K(\text{альбумин});$$

$$K(\text{предельное}) = 0,93 \times \sqrt{(QAlb)^2 + 6 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-3}}.$$

Все значения, полученные в результате лабораторных исследований, подверглись статистической обработке с помощью программы GraphpadPrism 6.0. Для исследуемых групп проводился анализ на нормальность распределения, в зависимости от типа которого применялись параметрические или непараметрические методы оценки выборок. Уровень значимости для всех статистических тестов принимался менее 0,05.

Для изучения связи между двумя переменными использовался метод ранговой корреляции по Спирмену. Для выявления различия в значении количественных параметров между исследуемыми группами применен U-критерий Манна–Уитни.

Результаты

Для определения MRZR в группе РС и группе сравнения исходно была проанализирована частота выявления повышенных индексов антител к анамнестическим антигенам: вирусу кори, вирусу краснухи, вирусу ветряной оспы. Результаты представлены на рисунке 1.

После получения индивидуальных значений показателей индексов антител у каждого обследуемого оценивалось наличие синтеза антител к одному, двум или трем вирусным агентам. Частота этих показателей в группе РС представлена на рисунке 2.

Для определения диагностической значимости MRZR в группах РС и группе сравнения проанализированы случаи положительной MRZR в группе РС и группе сравнения. Результаты представлены на рисунке 3.

Обобщенные данные по основным показателям интратекального гуморального иммунного ответа в группе РС и группе сравнения представлены в таблице 1 с указанием критериев достоверности.

Для оценки диагностической значимости основных лабораторных тестов определяли показатели диагностической чувствительности и специфичности. Данные представлены в таблице 2.

Для определения взаимосвязи клинических данных и MRZR, проанализированы данные клинических исследований и МРТ среди положительных по MRZR пациентов. Данные представлены в таблице 3.

У трех пациентов с РС (8,57%), при положительной MRZR, в ЦСЖ отсутствовали ОП-IgG и были нормальными уровни СЛЦ-Ig каппа/лямбда.

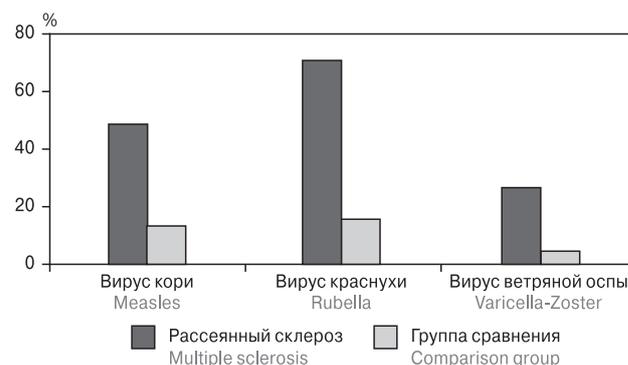


Рисунок 1. Частота выявления повышенных индексов антивирусных антител в группе РС и группе сравнения

Figure 1. Frequency of elevated antiviral antibodies indices in the MS group and the comparison group

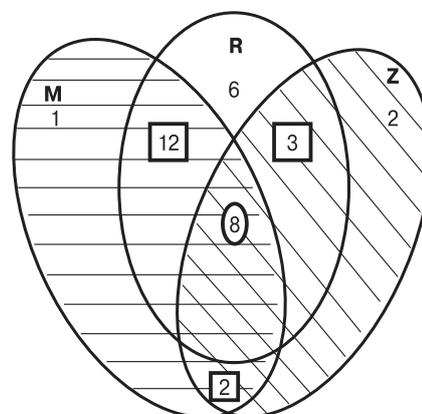


Рисунок 2. Частота выявления повышенных индексов антител к вирусным агентам в группе РС

Figure 2. Frequency of elevated antibodies indices to viral agents in the MS group

Примечание. М (Measles) — антитела к вирусу кори, R (Rubella) — антитела к вирусу краснухи, Z (Zoster) — антитела к вирусу ветряной оспы.

Note. M (Measles) — antibodies to measles virus, R (Rubella) — antibodies to rubella virus, Z (Zoster) — antibodies to varicella-zoster virus.

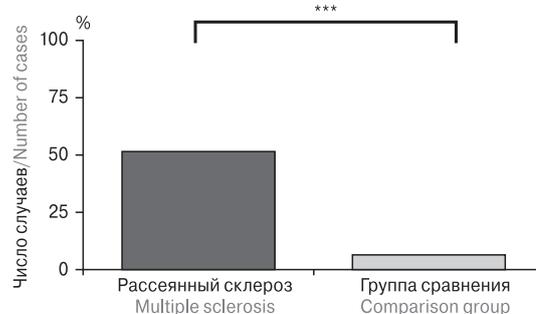


Рисунок 3. Случаи положительной MRZ-реакции в группе РС и группе сравнения

Figure 3. Cases of a positive MRZ reaction in the MS group and the comparison group

Обсуждение

В основе диагностики РС в настоящее время лежит комплекс клинических, лабораторных и инструментальных методов, не имеющих абсолютной специфичности и чувствительности.

В настоящем исследовании проведено сравнение диагностической чувствительности и специфичности нескольких лабораторных показателей, отражающих активацию В-клеточного им-

мунного ответа и применимых к диагностике РС. Показано, что специфичность показателя олигоклонального синтеза иммуноглобулинов (ОП-IgG), который на сегодняшний день включен в диагностические критерии McDonald 2017 г., а также индекс IgG и СЛЦ-Ig каппа и лямбда, не превышают значение 90%, в то время как показатели специфичности теста MRZ-2 и MRZ-3 обладают специфичностью в 92 и 100% соответственно [34]. По данным литературы, показа-

Таблица 1. Частота встречаемости повышенных показателей интратекального гуморального иммунного ответа у больных РС и в группе сравнения

Table 1. Frequency of increased intrathecal humoral immune response in patients with MS group and in the comparison group

Показатели интратекального гуморального иммунного ответа Indicators of intrathecal humoral immune response	РС (частота, %) MS (frequency, %)	Группа сравнения (частота, %) Comparison group (frequency, %)	P, критерий Фишера P, Fisher criterion
ИА ≥ 1,5 против вируса кори AI ≥ 1,5 Measles viruses	45,7	12,0	0,01
ИА ≥ 1,5 против вируса краснухи AI ≥ 1,5 Rubella viruses	67,5	16,0	0,0002
ИА ≥ 1,5 против вируса ветряной оспы AI ≥ 1,5 Varicella-Zoster viruses	17,0	4,0	0,22
ИА ≥ 1,5 против вирусов кори и краснухи AI ≥ 1,5 Measles and Rubella viruses	34,3	8,0	0,02
ИА ≥ 1,5 против вирусов краснухи и ветряной оспы AI ≥ 1,5 Rubella and Varicella-Zoster viruses	8,6	0,0	0,26
ИА ≥ 1,5 против вирусов кори и ветряной оспы AI ≥ 1,5 Measles and Varicella-Zoster viruses	5,7	0,0	0,5
ИА ≥ 1,5 против вирусов кори, краснухи и ветряной оспы AI ≥ 1,5 Measles, Rubella and Varicella-Zoster viruses	22,9	0,0	0,01
СЛЦ-Ig каппа в ЦСЖ Kappa FLC in CSF	45,7	8,0	0,0007
СЛЦ-Ig лямбда в ЦСЖ Lambda FLC in CSF	48,6	8,0	0,0008
ОП-IgG в ЦСЖ OP IgG in CSF	85,7	16,0	< 0,0001
Индекс IgG Index IgG	80,0	71,4	0,1

Примечание. ИА — индексы антител, СЛЦ — свободные легкие цепи, ЦСЖ — цереброспинальная жидкость, ОП — олигоклональный пул.
Note. AI — antibody indices, FLC — free light chains, CSF — cerebrospinal fluid, OP — oligoclonal pool.

Таблица 2. Сравнение показателей специфичности и чувствительности СЛЦ-Ig каппа и лямбда, индекса IgG, ОП-IgG, MRZR-2 и MRZR-3

Table 2. Comparison of specificity and sensitivity of kappa FLC and lambda FLC, index IgG, oligoclonal IgG, MRZR-2 and MRZR-3

Наименование теста Test	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	Диагностическая точность, % Diagnostic efficiency, %
СЛЦ-Ig каппа в ЦСЖ Kappa FLC in CSF	86,96	85,29	85,54
СЛЦ-Ig лямбда в ЦСЖ Lambda FLC in CSF	82,61	55,88	71,67
Индекс IgG Index IgG	56,00	68,57	61,67
ОП-IgG в ЦСЖ Olygoclonal IgG in CSF	85,70	84,00	85,00
MRZR-2	48,57	92,00	66,67
MRZR-3	22,86	100,00	55,00

тель специфичности MRZR достигает 97,5% [19]. Важно, что положительная MRZR вовсе не свойственна острым заболеваниям ЦНС и редко наблюдается при хронических воспалительных и невоспалительных заболеваниях ЦНС [27, 32].

Что касается чувствительности метода, по данным различных источников у 90–100% пациентов с РС обнаруживается интратекальный синтез антител против какого-либо одного из трех вирусных агентов (MRZR-1), у 40–80% — против двух (MRZR-2) и лишь у 20–40% пациентов с РС обнаруживается IgG против всех трех вирусов. В нашем исследовании получены следующие данные: антитела против 1 вирусного агента выявлены в 25,7% случаев, антитела к двум вирусным агентам преобладали в группе РС и составили 48,6%, антитела к 3 вирусным агентам отмечены в 22,9% случаев.

Нам удалось выявить достоверное увеличение интратекального синтеза антител к вирусу кори и краснухи в группе РС, а также достоверное увеличение интратекального синтеза всех трех групп антител (корь/краснуха/ветряная оспа).

Была выявлена корреляция показателей MRZR с уровнем EDSS среди пациентов с РС: самые высокие показатели EDSS были зарегистрированы среди пациентов, имеющих интратекальные антитела против трех вирусных агентов, а самые низкие показатели EDSS были среди MRZ-негативных пациентов. В то же время нам не удалось выявить значимых различий между показателями MRZR и количеством обострений за 1 год и 5 лет, количеством кон-

трастных очагов по результатам МРТ головного мозга, возрастом дебюта заболевания, а также длительностью течения РС и количеством дней болезни на момент проведения люмбальной пункции.

В группе РС выявлены 3 пациента (8,57%), у которых были отрицательные результаты СЛЦ-IgG каппа/лямбда и ОП-IgG, однако MRZR была положительная. Интересным может оказаться тот факт, что положительная MRZR может выявляться в отсутствие ОП-IgG у $\frac{1}{3}$ пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим РС и у $\frac{2}{3}$ пациентов со вторично- и первично-прогрессирующими формами [33]. Таким образом, MRZR может быть положительна среди ОП-IgG-негативных пациентов с разными формами течения РС, что указывает на возможность комплексного использования этих лабораторных тестов, как дополняющих друг друга.

В литературе существуют неоднозначные данные о специфичности MRZR для аутоиммунных заболеваний ЦНС в целом [15, 20]. У пациентов с оптиконейромиелитом MRZR была положительной в 1 из 42 случаев [21]. Положительная MRZR редко наблюдалась у пациентов с хроническим нейроборрелиозом (2/54), а также нейросаркоидозом (2/26) [14, 15, 17].

СЛЦ-IgG каппа/лямбда, MRZR и олигоклональный синтез иммуноглобулинов представляют собой проявления единого феномена — интратекального синтеза иммуноглобулинов в пределах ЦНС. Однако ввиду различных показателей чувствительности этих тестов, а так-

Таблица 3. Сопоставление клинических данных с результатами MRZR в группе РС

Table 3. Comparison of clinical data with the results of MRZR in the MS group

Данные клинических исследований и МРТ Clinical data and MRI	MRZR-отрицательные MRZR negative patients	MRZR-положительные MRZR positive patients	P, критерий Фишера P, Fisher criterion
Количество обострений за 1 год, количество раз Number of exacerbations for 1 year, number of times	1 (1, 4)	1 (1, 2)	ns (0,8268)
Количество обострений за 5 лет, количество раз Number of exacerbations in 5 years, number of times	1 (1, 7)	2 (1, 6)	ns (0,7835)
EDSS на последнем осмотре, баллы EDSS at the last survey, points	2 (1,5–6)	3 (1,5–6)	0,053
Количество контрастных очагов Number of contrasting foci	0 (0–2)	0 (0–2)	ns (0,6067)
Возраст дебюта, лет Age of debut, years	29,76±2,443 (14,58)	34,07±3,044 (22,54)	ns (0,2799)
Количество дней болезни на момент пункции Number of days of illness at the time of puncture	645 (0, 5146)	1404 (111, 12077)	ns (0,3741)
Длительность РС, дней MS duration, days	1807 (454, 6417)	2232 (808, 13594)	ns (0,5917)
Количество дней между первым и вторым обострением Number of days between the first and second exacerbations	799 (29, 5079)	610,5 (30, 11477)	ns (0,6192)

Примечание. ns — различия не значимы (not significant).

Note. ns — differences are not significant.

же в связи с разнообразием клинических форм РС, диагностическая значимость лабораторных методов исследования на разных этапах формирования болезни может быть неоднозначной. Так, отмечено, что MRZR встречалась статистически значимо чаще у пациентов с КИС, который трансформировался через 2 года в достоверный РС. Сочетание положительных анализов на ОП-IgG и положительная MRZR при наличии 2 и более очагов на МРТ обладали наибольшей диагностической значимостью положительного результата, чем сочетания других показателей [3, 6, 7, 11].

Настоящее исследование демонстрирует возможную практическую значимость использования MRZR в качестве лабораторного метода диагностики РС. Это может способствовать более ранней диагностике и своевременному назначению лечения, что, в свою очередь, позволит отсрочить инвалидизацию у пациентов с РС.

MRZR обладает высокой специфичностью в качестве лабораторного диагностического теста у пациентов с РС. Использование MRZR для диагностики сложных случаев — у пациентов с отрицательными значениями других лабораторных диагностических показателей (СЛЦ Ig каппа/лямбда, ОП-IgG в ЦСЖ) представляется целесообразным для подтверждения диагноза РС. Комплексная оценка интратекального иммунного ответа является перспективной для повышения точности диагностики и оценки тяжести течения РС.

Благодарности

Коллектив авторов выражает свою признательность сотрудникам ЗАО «Аналитика» (Москва) за предоставленные реактивы компании Euroimmun (Германия), благодаря которым мы смогли выполнить данное исследование.

Список литературы/References

1. Евдошенко Е.П., Маслянский А.Л., Заславский Л.Г., Скоромец А.А., Зюзгин И.С., Рябыкина О.Е., Тотолян Н.А., Зуева Е.Е., Лапин С.В., Тотолян А.А. Возможности анти-B-клеточной терапии при рассеянном склерозе // Медицинская иммунология. 2009. Т. 11, № 1. С. 63–70. [Evdoshenko E.P., Maslyansky A.L., Zaslavsky L.G., Skoromets A.A., Ziuuzgin I.S., Riabykina O.E., Totolian N.A., Zueva E.E., Lapin S.V., Totolian A.A. Opportunities of anti B-cell therapy in multiple sclerosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, vol. 11, no. 1, pp. 63–70. doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-63-70 (In Russ.)]
2. Маслянский А.Л., Евдошенко Е.П., Заславский Л.Г., Скоромец А.А., Зюзгин И.С., Рябыкина О.Е., Тотолян Н.А., Лапин С.В., Станкевич Ю.А., Тотолян А.А. Роль В-лимфоцитов в патогенезе рассеянного склероза и новые возможности терапии // Молекулярная медицина. 2010. № 2. С. 22–27. [Maslyansky A.L., Evdoshenko E.P., Zaslavsky L.G., Skoromets A.A., Zyuzgin I.S., Ryabykina O.E., Totolian N.A., Lapin S.V., Stankevich Yu. A., Totolian A.A. Role of B-lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis and new possibilities of therapy. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2010, no. 2, pp. 22–27. (In Russ.)]
3. Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Евдошенко Е.П., Макшаков Г.С. Диагностическая информативность показателей интратекального синтеза свободных легких цепей иммуноглобулинов при рассеянном склерозе // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 3. С. 235–244. [Nazarov V.D., Lapin S.V., Surkova E.A., Evdoshenko E.P., Makshakov G.S., Totolian A. Diagnostic and prognostic significance of intrathecal synthesis of immunoglobulin free light chains in multiple sclerosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 3, pp. 235–244. doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-235-244 (In Russ.)]
4. Тотолян Н.А., Георгеос Ф., Смирнов А.Ю. Методические особенности определения иммунологических показателей в цереброспинальной жидкости // Лабораторное дело. 1990. № 7. С. 57–60. [Totolyan N.A., Georges F., Smirnov A.Yu. Methodological features of the definition of immunological indices in cerebrospinal fluid. *Laboratornoe delo = Laboratory Medicine*, 1990, no. 7, pp. 57–60. (In Russ.)]
5. Тотолян Н.А., Готовчиков А.А., Лапин С.В., Максимов И.В., Кодзаева А.Ю., Прахова Л.Н., Ильвес А.Г., Скоромец А.П., Скоромец А.А. Интратекальный синтез иммуноглобулинов в диагностике и дифференциальной диагностике рассеянного склероза // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2012. Т. 112, № 9. С. 73–86. [Totolian N.A., Gotovchikov A.A., Lapin S.V., Maksimov I.V., Kodzaeva A.Yu., Prakhova L.N., Il'ves A.G., Skoromets A.P., Skoromets A.A. Intrathecal immunoglobulin production in the diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2012, vol. 112, pp. 73–86. (In Russ.)]
6. Тотолян Н.А., Грязева И.В., Климович В.Б., Тотолян А.А. Интратекальный синтез свободных легких цепей иммуноглобулинов и его связь с другими иммунными нарушениями у больных рассеянным склерозом // Иммунология. 1994. № 1. С. 54–57. [Totolian N.A., Griazeva I.V., Klimovich V.B., Totolian A.A. Intrathecal synthesis of free light chains of immunoglobulins and its connection with other immunological aberration in patients with multiple sclerosis. *Immunologiya*, 1994, no. 1, pp. 54–57. (In Russ.)]
7. Тотолян Н.А., Грязева И.В., Климович В.Б., Тотолян А.А. Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в биологических жидкостях больных рассеянным склерозом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1997. № 5. С. 34–38. [Totolian N.A., Griazeva I.V., Klimovich V.B., Totolian A.A. Free light-chain immunoglobulins in the biological fluids of patients with multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 1997, vol. 97, pp. 34–38. (In Russ.)]

8. Тотолян Н.А., Скоромец А.А., Барбас И.М., Трофимова Т.Н. Актуальные практические вопросы диагностики рассеянного склероза // Ученые записки СПбГМУ им. академика И.П. Павлова. 2000. Т. 7, № 3. С. 37–48. [Totolian N.A., Skoromets A.A., Barbas I.M., Trofimova T.N. Current practical questions of diagnosis of multiple sclerosis. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akademika I.P. Pavlova = The Scientific Notes of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University, 2000, vol. 3, pp. 37–48. (In Russ.)*]
9. Bonnan M. Does disease-irrelevant intrathecal synthesis in multiple sclerosis make sense in the light of tertiary lymphoid organs? *Front. Neurol.*, 2014, no. 5. doi: 10.3389/fneur.2014.00027
10. Brecht I., Weissbrich B., Braun J., Toyka K., Weishaupt A., Buttmann M. Intrathecal, polyspecific antiviral immune response in oligoclonal band negative multiple sclerosis. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 7: e40431. doi: 10.1371/journal.pone.0040431
11. Brettschneider J., Tumani H., Kiechle U., Muehe R., Richards G., Lehmsiek V., Ludolph A.C., Otto M. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 11: 7638. doi: 10.1371/journal.pone.0007638
12. Conrad A.J., Chiang E.Y., Andeen L.E., Avolio C., Walker S.M., Baumhertner R.W., Mirzayan R., Tourtellotte W.W. Quantitation of intrathecal measles virus IgG antibody synthesis rate: subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 1994, vol. 54, no. 1–2, pp. 99–108. doi: 10.1016/0165-5728(94)90236-4
13. Evdoshenko E., Maslyanskiy A., Lapin S., Zaslavsky L., Dobson R., Skoromets A., Bar-Or A. Dynamics of B-Cell Populations in CSF and Blood in Patients Treated with a Combination of Rituximab and Mitoxantrone. *ISRN Neurology*, 2013, 8 p. doi: 10.1155/2013/748127
14. Felgenhauer K., Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin. Investig.*, 1992, vol. 70, no. 1, pp. 28–37. doi: 10.1007/bf00422934
15. Graef I.T., Henze T., Reiber H. Polyspecific immune reaction in the central nervous system in autoimmune diseases with CNS involvement. *Z. Arztl. Fortbild.*, 1994, vol. 88, pp. 587–591. doi: 10.1186/s12987-015-0024-8
16. Hela-Felicitas P., Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients — follow-up and clinical implications. *Cerebrospinal. Fluid Res.*, 2005, vol. 2, pp. 3–10. doi: 10.1186/1743-8454-2-3
17. Hottenrott T., Dersch R., Berger B., Rauer S., Eckenweiler M., Huzly D., Stich O. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response in neurosarcoidosis, acute disseminated encephalomyelitis and autoimmune encephalitis compared to multiple sclerosis in a tertiary hospital cohort. *Fluids Barriers CNS*, no. 12: 27. doi: 10.1186/s12987-015-0024-8
18. Jacobi C., Lange P., Reiber H. Quantitation of intrathecal antibodies in cerebrospinal fluid of subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis: discrimination between microorganism-driven and polyspecific immune response. *J. Neuroimmunol.*, 2007, vol. 187, no. 1–2, pp. 139–146. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.04.002
19. Jarius S., Eichhorn P., Franciotta D., Peterit H.F., Akman-Demir G., Wick M., Wildemann B. The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J. Neurol.*, 2017, vol. 264, no. 3, pp. 453–466. doi: 10.1007/s00415-016-8360-4
20. Jarius S., Eichhorn P., Jacobi C., Wildemann B., Wick M., Voltz R. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity. *J. Neurol. Sci.*, 2009, vol. 280, no. 1–2, pp. 98–100. doi: 10.1371/journal.pone.0028094
21. Jarius S., Franciotta D., Bergamaschi R., Rauer S., Wandinger K.P., Peterit H.F., Maurer M., Tumani H., Vincent A., Eichhorn P., Wildemann B., Wick M., Voltz R. Polyspecific, antiviral immune response distinguishes multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2008, vol. 79, pp. 1134–1136. doi: 10.1136/jnnp.2007.133330
22. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 1983, vol. 33, no. 11, pp. 1444–1452. doi: 10.1212/WNL.33.11.1444
23. Krumbholz M., Theil D., Cepok S., Hemmer B., Kivisäkk P., Ransohoff R.M., Hofbauer M., Farina C., Derfuss T., Hartle C., Newcombe J., Hohlfeld R., Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*, 2006, vol. 129, pt. 1, pp. 200–211. doi: 10.1093/brain/awh680
24. Quentin C.D., Reiber H. Fuchs heterochromic cyclitis: rubella virus antibodies and genome in aqueous humor. *Am. J. Ophthalmol.*, 2004, vol. 138, no. 1, pp. 46–54. doi: 10.1016/j.ajo.2004.02.055
25. Ragheb S., Li Y., Simon K., Vanhaerents S., Galimberti D., De Riz M., Lisak R. Multiple sclerosis: BAFF and CXCL13 in cerebrospinal fluid. *Mult. Scler.*, 2011, vol. 17, no. 7, pp. 819–829. doi: 10.1177%2F1352458511398887
26. Reiber H. Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns: essentials in neurology and psychiatry. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 2016, vol. 74, no. 6, pp. 501–512. doi: 10.1590/0004-282x20160066
27. Reiber H. Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolupus and Guillain-Barre syndrome: immune network connectivity in chronic diseases. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, 2017, vol. 75, no. 8, pp. 580–588. doi: 10.1590/0004-282X20170081
28. Reiber H., Kruse-Sauter H., Quentin C.D. Antibody patterns vary arbitrarily between cerebrospinal fluid and aqueous humor of the individual multiple sclerosis patient: specificity-independent pathological B cell function. *J. Neuroimmunol.*, 2015, vol. 278, pp. 247–254. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.013
29. Reiber H., Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin. Chem.*, 1991, vol. 37, no. 7, pp. 1153–1160.
30. Reiber H., Ungefähr S., Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 1998, vol. 4, no. 3, pp. 111–117. doi: 10.1177%2F135245859800400304
31. Robinson-Agramonte M., Reiber H., Cabrera-Gomez J., Galvizu R. Intrathecal polyspecific immune response to neurotropic viruses in multiple sclerosis: a comparative report from Cuban patients. *Acta Neurol. Scand.*, 2007, vol. 115, no. 5, pp. 312–318. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00755.x
32. Sindic C.J., Monteyne P., Laterre E.C. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 1994, vol. 54, pp. 75–80. doi: 10.1016/0165-5728(94)90233-X

33. Stich O., Kluge J., Speck J., Rauer S. Oligoclonal restriction of antiviral immunoreaction in oligoclonal band-negative MS patients. *Acta Neurol. Scand.*, 2015, vol. 131, pp. 381–388. doi: 10.1111/ane.12350
34. Thompson A.J., Banwell B. L., Barkhof F., Carroll W.M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., Fujihara K., Galetta S.L., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Ann M.R., Miller A.E., Miller D.H., Montalban X., Mowry E.M., Sorensen P.S., Tintor M., Traboulsee A.L., Trojano M., Uitdehaag B.M.J., Vukusic S., Waubant E., Weinstenker B.G., Reingold S.C., Cohen J.A. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.*, 2018, vol. 17, no. 2, pp. 162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2

Авторы:

Мошникова А.Н., младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра молекулярной медицины МЗ РФ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ (ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова), Санкт-Петербург, Россия;

Максимчук В.К., студент 6 курса ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Лапин С.В., к.м.н., зав. лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра молекулярной медицины МЗ РФ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Назаров В.Д., младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра молекулярной медицины МЗ РФ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Суркова Е.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра молекулярной медицины МЗ РФ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Новиков С.А., д.м.н., профессор кафедры офтальмологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Макшаков Г.С., врач-невролог, сотрудник Городского центра рассеянного склероза и аутоиммунных заболеваний (ГБУЗ ГКБ № 31), Санкт-Петербург, Россия;

Крутецкая И.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова Россия, Санкт-Петербург, Россия;

Краснов В.С., доцент кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Кушнир Я.Б., врач-невролог клиники неврологии № 1 ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Неофидов Н.А., аспирант кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; врач-невролог Городского центра рассеянного склероза и аутоиммунных заболеваний (ГБУЗ ГКБ № 31), Санкт-Петербург, Россия;

Тотolian Н.А., д.м.н., профессор кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Скоромец А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Евдошенко Е.П., к.м.н., врач-невролог, руководитель Городского центра по лечению рассеянного склероза и аутоиммунных заболеваний (ГБУЗ ГКБ № 31); докторант кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

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

Authors:

Moshnikova A.N., Junior Researcher, Autoimmune Diseases Diagnostics Laboratory, Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Maksimchuk V.K., 6th Year Student, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head of the Autoimmune Diseases Diagnostics Laboratory, Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Nazarov V.D., Junior Researcher, Autoimmune Diseases Diagnostics Laboratory, Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Surkova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Autoimmune Diseases Diagnostics Laboratory, Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Novikov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Ophthalmology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Makshakov G.S., Neurologist, City Center for Multiple Sclerosis and Autoimmune Diseases Treatment, St. Petersburg, Russian Federation

Krutetskaya I.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology, A.M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Krasnov V.S., Associate Professor, Department of Neurology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Kushnir Ya.B., Neurologist, Neurology Clinic No. 1, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Neofidov N.A., PhD Student, Department of Neurology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Neurologist, City Center for Multiple Sclerosis and Autoimmune Diseases Treatment, St. Petersburg, Russian Federation;

Totolian N.A., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Neurology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Skoromets A.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Neurology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Evdoshenko E.P., PhD (Medicine), Neurologist, Head of the City Center for Multiple Sclerosis and Autoimmune Diseases Treatment, St. Petersburg, Russian Federation; Doctoral Student, Department of Neurology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Поступила в редакцию 18.09.2018
Отправлена на доработку 13.03.2019
Принята к печати 14.03.2019

Received 18.09.2018
Revision received 13.03.2019
Accepted 14.03.2019

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ IgM И IgG К КОМПЛЕКСУ ПОЛИСАХАРИДОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ *S. PNEUMONIAE* И *H. INFLUENZAE* ТИПА В У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ И БРОНХОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАМИ «ПНЕВМО-23» И «АКТ-ХИБ»

Е.С. Коровкина¹, А.В. Краковская², М.П. Костинов^{1,3}, В.К. Козлов²,
Н.Е. Ястребова¹, О.О. Магаршак¹, В.Б. Полищук¹

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

² ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии органов дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

³ ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.И. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Ведущими патогенами в развитии обострения хронических бронхолегочных заболеваний в педиатрической практике являются *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, при этом серотип возбудителя во многих случаях определяет тяжесть заболевания. Вакцинопрофилактика пневмококковой и гемофильной инфекций оправдана и рекомендована лицам с хронической патологией, однако нет четких рекомендаций по комбинированному применению препаратов «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» у детей с пороками развития легких и бронхов в сочетании с бронхиальной астмой. *Материалы и методы.* В исследование включено 92 пациента (возраст 0–17 лет) с хроническими бронхолегочными заболеваниями; контрольную группу составили 55 здоровых детей, а также 57 невакцинированных детей с хронической бронхолегочной патологией. Моно- или комбинированная вакцинация препаратами «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» была проведена в периоде ремиссии основного заболевания. Уровни IgM и IgG к антигенам *H. influenzae* и к полисахариду *H. influenzae* тип b, к полисахаридам *S. pneumoniae*, входящим в состав вакцины (серотипов 3, 6B, 9N, 23F), и к комплексу полисахаридных антигенов вакцинного препарата определялись с помощью ИФА, разработанного в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Статистическая обработка данных проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с помощью программы «Statistica 5.0». *Результаты.* Введение вакцины «Пневмо-23» детям с хронической бронхолегочной патологией сопровождалось синтезом IgG к ПС серотипов 3, 6B, 9N, 23F; через 6 месяцев отмечено нарастание уровня антител к 3 и 23F серотипам; через 18 месяцев сохранялись высокие титры антител к полисахаридам, входящим в вакцину «Пневмо-23». Одно-

Адрес для переписки:

Коровкина Елена Сергеевна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А,
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 916 717-61-15 (моб.). Факс: 8 (495) 917-49-00.
E-mail: eskorovkina@yandex.ru

Contacts:

Elena S. Korovkina
105064, Russia, Moscow, Malii Kazionniy lane, 5A,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 916 717-61-15 (mobile). Fax: +7 (495) 917-49-00.
E-mail: eskorovkina@yandex.ru

Библиографическое описание:

Коровкина Е.С., Краковская А.В., Костинов М.П., Козлов В.К., Ястребова Н.Е., Магаршак О.О., Полищук В.Б. Динамика уровней IgM и IgG к комплексу полисахаридов различных серотипов *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа b у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких и бронхов, вакцинированных препаратами «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 713–722. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-713-722

Citation:

Korovkina E.S., Krakovskaya A.V., Kostinov M.P., Kozlov V.K., Jastrebova N.E., Magarshak O.O., Polishchuk V.B. Dynamics in IgM and IgG antibodies against a polysaccharide capsule-containing complex of various *S. pneumoniae* and *H. influenzae* type b serotypes in children with chronic lung and bronchial inflammatory diseases after vaccination with “Pneumo-23” and “Act-HIB” // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 713–722. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-713-722

временно отмечался достоверный прирост уровня IgM к полисахариду 23F и к полисахаридам, входящим в вакцину, через 1 месяц; через 18 месяцев после вакцинации уровни IgM к серотипам 6B, 9N сохранялись, с достоверным увеличением показателей к серотипам 3, 23F. При оценке эффективности вакцинопрофилактики против гемофильной типа b инфекции установлено, что через 1, 6, 18 месяцев после введения препарата «Акт-ХИБ», отмечалось достоверное увеличение уровней IgM к ПС, входящим в вакцину, а также нарастание уровня IgG к полисахариду *H. influenzae* типа b через 1 месяц после введения вакцины с сохранением высокого титра через 6 и 18 месяцев. **Выводы.** Вакцинация препаратами «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями сопровождается активацией адаптивного иммунитета, проявляющейся синтезом IgM и IgG к вакцинным антигенам.

Ключевые слова: IgG, IgM, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b, вакцинопрофилактика, дети, хронические воспалительные заболевания легких, бронхиальная астма, адаптивный иммунитет.

DYNAMICS IN IgM AND IgG ANTIBODIES AGAINST A POLYSACCHARIDE CAPSULE-CONTAINING COMPLEX OF VARIOUS *S. PNEUMONIAE* AND *H. INFLUENZAE* TYPE B SEROTYPES IN CHILDREN WITH CHRONIC LUNG AND BRONCHIAL INFLAMMATORY DISEASES AFTER VACCINATION WITH “PNEUMO-23” AND “ACT-HIB”

Korovkina E.S.^a, Krakovskaya A.V.^b, Kostinov M.P.^{a,c}, Kozlov V.K.^b, Jastrebova N.E.^a, Magarshak O.O.^a, Polishchuk V.B.^a

^a I. Mechnikov Scientific-research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Far-Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration — Research Institute of Motherhood and Childhood Protection, Khabarovsk, Russian Federation

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

Abstract. A lead place among pathogens resulting in pediatric chronic bronchopulmonary diseases is held by *S. pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Vaccination against pneumococcal and hemophilic infections is approved and recommended for patients with chronic pathologies, but no clear recommendations for combined use of Pneumo-23 and Act-HIB vaccines in children with congenital pulmonary malformations and bronchial asthma were proposed. **Materials and methods.** There were enrolled 92 children aged 0–17 years old with chronic bronchopulmonary diseases; 55 healthy children, and 57 unvaccinated children with chronic broncho-pulmonary pathology were included into control group. Mono- and combination vaccination by Pneumo-23 and/or Act-HIB was performed in remission period. IgM and IgG level against *H. influenzae* antigens, *H. influenzae* type b, to *S. pneumoniae* (serotypes 3, 6B, 9N, 23F) vaccine-specific polysaccharide as well as polysaccharide complex antigens were measured by using ELISA developed by us. Statistical processing was carried out by methods of descriptive, parametric and nonparametric statistics by using Statistica 5.0 software. **Results.** Vaccination with Pneumo 23 was accompanied by IgG production against serotypes 3, 6, 9N, 23F-derived polysaccharide. A markedly increased anti-serotype 3 and 23F antibody level was observed 6 months after vaccination. Moreover, a significant increase in anti-polysaccharide 23F and anti-vaccine-derived polysaccharide IgM levels was found 1 month after the onset. In addition, anti-serotype 6B and 9N IgM antibodies were maintained 18 months after vaccination at high level, whereas it was significantly elevated against serotypes 3, 23F. Assessing an effectiveness of vaccine prophylaxis against Hemophilus type b infection, it was shown that a significantly increased anti-vaccine-derived polysaccharide IgM level was found 1, 6, 18 months after Act-HIB vaccination. In addition, IgG to the anti-*H. influenzae* type b polysaccharide tended to rise 1 month after the vaccination. **Summary.** Children with chronic bronchopulmonary diseases vaccinated by Pneumo-23 and Act-HIB demonstrated activated adaptive immunity manifested by increased vaccine-derived antigen-specific IgM and IgG antibodies.

Key words: IgG, IgM, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b, vaccination, children, chronic inflammatory lung diseases, bronchial asthma, adaptive immunity.

Введение

В современной педиатрии эффективная профилактика повторных эпизодов респираторных инфекций у пациентов с патологией органов дыхания представляет серьезную проблему. Наиболее часто у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких (ХВЗЛ) высеваются *Haemophilus influenzae* (64% больных), *Streptococcus pneumoniae* (27%) и *Moraxella catarrhalis* (9%) [1, 2, 7]. Основным методом лече-

ния ХВЗЛ у детей является антибактериальная терапия [2, 3, 13]. При этом не стоит забывать о формировании резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, поскольку этот процесс неоднозначен и оказывает разное влияние на исход воспалительного процесса [15, 16]. В литературе имеется ограниченное количество исследований, посвященных изменениям уровней поствакцинальных IgG и IgM у детей с пороками развития легких и бронхов в сочетании с бронхиальной астмой,

вакцинированных против гемофильной типа b и пневмококковой инфекций.

Целью проведенного исследования явилась оценка иммуногенности вакцин «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» у детей с ХБЛП, впервые вакцинированных против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций.

Задачами исследования являлись:

– изучение уровней IgM и IgG к полисахаридам (ПС) вакцины «Пневмо-23» у привитых детей с ХБЛП;

– изучение динамики уровней IgM и IgG в сыворотках крови к ПС *H. influenzae* типа b у детей с ХБЛП, вакцинированных препаратом «Акт-ХИБ».

Материалы и методы

Работа выполнена на следующих базах: Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — НИИ охраны материнства и детства, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва).

В исследование было включено 92 ребенка в возрасте от 0 до 17 лет с ХБЛП. Контрольную группу составили 55 здоровых детей, а также 57 невакцинированных детей с ХБЛП. Все наблюдаемые дети были распределены в 3 клинические группы: ПРЛ (пороки развития бронхов и легких) — 48 пациентов, ПРЛ+БА (пороки развития бронхов и легких в сочетании с бронхиальной астмой) — 18 пациентов, БА (бронхиальная астма) — 26 пациентов (табл. 1).

В период обострения основного заболевания все дети получали базисную терапию, включав-

шую мукорегуляторы, бронхолитики, по показаниям — антибактериальную терапию, топические глюкокортикостероидные гормоны.

Вакцинация препаратами «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» была проведена через 2–4 недели после последнего обострения для минимизации риска повторного обострения ХБЛП. Вакцинированных детей наблюдали в течение 18 и более месяцев. Для вакцинации против пневмококковой инфекции детей в возрасте 2 и более лет применялась полисахаридная пневмококковая вакцина, поскольку конъюгированная полисахаридная пневмококковая вакцина не была зарегистрирована на территории Российской Федерации. Также эта группа пациентов ранее не была привита против гемофильной типа b инфекции.

Вакцинные препараты:

– «Пневмо-23» — полисахаридная поливалентная пневмококковая вакцина (Санофи Пастер, Франция), каждая доза (0,5 мл) которой содержит очищенные капсульные ПС *S. pneumoniae* 23 серотипов [5];

– «Акт-ХИБ» — конъюгированная вакцина для профилактики инфекций, вызываемых *H. influenzae* типа b (Санофи Пастер, Франция); каждая доза вакцины содержит 10 мкг очищенного капсульного полисахарида *H. influenzae* типа b, конъюгированного с 30 мкг столбнячного анатоксина [5].

Вакцины вводились однократно внутримышечно в дозе 0,5 мл согласно инструкции [5, 8, 12] после получения письменного информированного согласия от родителей для участия в исследовании.

Таблица 1. Распределение пациентов

Table 1. The distribution of patients

Возраст Age	ПРЛ (n = 48) MBL		ПРЛ+БА (n = 18) MBL+BA		БА (n = 26) BA	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
От 0 до 1 года 11 месяцев 29 дней 0 to 1 years 11 months 29 days	6	12,5	2	11,11	4	15,39
От 2 до 3 лет 11 месяцев 29 дней 2 to 3 years 11 months 29 days	26	54,17	13	72,22	14	53,85
От 4 до 5 лет 11 месяцев 29 дней 4 to 5 years 11 months 29 days	11	22,92	2	11,11	6	23,07
От 6 лет и старше 6 years and older	5	10,41	2	11,11	2	7,69

Примечание. ПРЛ — пороки развития бронхов и легких; ПРЛ+БА — пороки развития бронхов и легких в сочетании с бронхиальной астмой; БА — бронхиальная астма.

Note. MBL — malformations of the bronchi and lung; MBL+BA — malformations of the bronchi and lungs, combined with bronchial asthma; BA — bronchial asthma).

Методики определения гуморальных факторов иммунитета. Уровни IgM и IgG к ПС *S. pneumoniae*, входящим в состав вакцины (серотипов 3, 6В, 9N, 23F), и к комплексу полисахаридных антигенов вакцинного препарата, а также уровни IgM и IgG к антигенам *H. influenzae*, проводились с помощью ИФА, разработанного в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова [9, 10], оценка уровней иммуноглобулинов производилась в условных единицах (у.е.) согласно инструкции к реактивам.

Методика статистической обработки. Статистическая обработка данных проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с помощью программы «Statistica 5.0» на персональном компьютере.

Результаты

Динамика уровней IgM и IgG в сыворотках крови к ПС вакцины «Пневмо-23» у привитых детей с ХБЛП

Пациенты с ХБЛП, у которых из индуцированной мокроты, трахеального аспирата или промывных вод бронхов высеивали *S. pneumoniae*, при достижении ремиссии заболевания после выписки из стационара были вакцинированы препаратом «Пневмо-23». Данные изменений уровней IgM к ПС, входящим в состав вакцины «Пневмо-23», и к ПС различных серотипов *S. pneumoniae* у детей данной категории представлены в таблице 2.

Содержание IgM к ПС, входящим в состав вакцины «Пневмо-23», повышалось через

1 месяц после вакцинации в 2 раза, составляло $54,85 \pm 12,00$ у.е. против исходных $27,54 \pm 4,69$ ($p < 0,05$), и оставалось достоверно высоким ($p < 0,05$) через 18 месяцев после вакцинации. Содержание IgM к полисахариду 23F через месяц после вакцинации достигало $42,39 \pm 6,11$ у.е. против $25,35 \pm 3,89$ ($p < 0,05$). Через 18 месяцев после введения препарата «Пневмо-23» у детей уровень антител к серотипам пневмококка 3 и 23F был достоверно выше и составлял $56,19 \pm 4,40$ у.е. ($p < 0,01$) и $64,18 \pm 5,72$ у.е. ($p < 0,001$) соответственно. Уровни IgM к ПС серотипов 6В и 9N достоверно не изменялись на протяжении всего времени наблюдения.

Важным иммунным феноменом при вакцинации является высокодозная толерантность, при которой организм отказывается отвечать образованием антител на введение избыточной дозы антигена. Иногда при этом наблюдают значительное снижение уровня иммунного ответа. Известно, что малые (субиммуногенные) дозы полисахарида пневмококка серотипа 3 вызывают толерантность, умеренные дозы — иммунный ответ, частично маскируемый периферической нейтрализацией антител персистирующим антигеном, а большие дозы — толерантность, обусловленную прямой инактивацией В-лимфоцитов антигеном [6, 11, 14]. Дети с пороками развития легких имеют в анамнезе частые обострения основного заболевания. Учитывая, что важнейшими патогенами при ХБЛП у детей являются *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, иммунный ответ на которые типоспецифичен, возникает вопрос об иммун-

Таблица 2. Уровни IgM в сыворотках крови к полисахаридам, входящим в состав вакцины «Пневмо-23», и к полисахаридам различных серотипов *S. pneumoniae* у детей с ХБЛП после вакцинации пневмококковой вакциной

Table 2. The levels of IgM in the sera to the polysaccharides included of the vaccine Pneumo-23 and to the polysaccharides of different serotypes of *S. pneumoniae* in children with chronic bronchopulmonary pathology after vaccination with pneumococcal vaccine

ПС различных серотипов <i>S. pneumoniae</i> The polysaccharides of different serotypes of <i>S. pneumoniae</i>	Уровни IgM (у.е./мл) (M±m) The levels of IgM (conditional unit/ml) (M±m)			
	До вакцинации Before vaccination n = 23	Через 1 мес. после вакцинации 1 month after vaccination n = 23	Через 6 мес. после вакцинации 6 months after vaccination n = 17	Через 18 мес. после вакцинации 18 months after vaccination n = 15
3	26,88±5,64	36,64±6,85	34,12±6,84	56,19±4,40**
6-В	32,68±4,45	38,21±5,25	29,05±4,51	45,27±3,52
9-N	29,69±5,86	33,65±6,05	25,90±4,98	42,48±3,51
23-F	25,35±3,89	42,39±6,11*	39,71±4,71	64,18±5,72**
ПС, входящие в «Пневмо-23» The polysaccharides included of the vaccine Pneumo-23	27,54±4,69	54,85±12,00*	29,78±5,72	48,55±4,67*

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; статистический анализ проводился между группами 1–2, 1–3, 1–4.

Note. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; statistical analysis was carried out between groups 1–2, 1–3, 1–4.

ной толерантности при многократных контактах с данными серотипами возбудителей [1, 2, 4]. Возможно поэтому в наших исследованиях мы не получили закономерный иммунный ответ на исследуемые серотипы пневмококка. По-видимому, при частых субиммунных ответах на антиген сформировалась иммунологическая толерантность, и введение вакцины «Пневмо-23» не привело к ожидаемо высоким титрам антител. Таким образом, чтобы избежать вероятности формирования толерантности и предотвратить повторы обострений основного заболевания, детям из групп риска необходимо более раннее введение вакцин против пневмококковой инфекции.

Анализ уровней IgG к различным серотипам *S. pneumoniae* и к ПС, входящим в состав вакцины «Пневмо-23», показал, что у всех больных, вакцинированных препаратом «Пневмо-23» в поствакцинальном периоде наблюдали нарастание уровня антител (табл. 3).

Нарастание уровня IgG к ПС 3, 6В, 9N, 23F серотипов, а также к ПС, входящим в состав вакцины «Пневмо-23», регистрировали через 1 месяц после вакцинации. Уровень IgG к 3 и 23F серотипам оставался достоверно высоким через 6 месяцев после вакцинации — $60,45 \pm 9,27$ у.е. ($p < 0,01$) и $58,04 \pm 10,44$ у.е. ($p < 0,05$) соответственно. Достоверно высокие уровни антител через 18 месяцев после вакцинации регистрировались к серотипу 23F и к ПС, входящим в состав вакцины «Пневмо-23»: $46,89 \pm 4,58$ у.е. и $48,26 \pm 6,33$ у.е. ($p < 0,05$) соответственно.

Следовательно, введение вакцины «Пневмо-23» детям с ХБЛП сопровождалось синтезом IgG к ПС серотипов 3, 6В, 9N, 23F. При этом установлено, что через 18 месяцев после вакцинации сохраняются высокие уровни антител к ПС, входящим в состав вакцины «Пневмо-23».

Динамика уровней IgM и IgG в сыворотках крови к полисахариду *H. influenzae* типа b у детей с ХБЛП вакцинированных препаратом «Акт-ХИБ»

Пациенты с ХБЛП, у которых из индуцированной мокроты, трахеального аспирата или промывных вод бронхов высеивали *H. influenzae*, при достижении ремиссии заболевания после выписки из стационара были вакцинированы препаратом «Акт-ХИБ».

Уровни IgM к ПС клеточной стенки *H. influenzae* у детей с ХБЛП, полученные в процессе вакцинации препаратом «Акт-ХИБ», отражены в таблице 4.

Анализ результатов вакцинации детей с ХБЛП препаратом «Акт-ХИБ» показал повышение уровня IgM к клеточной стенке *H. influenzae* через 1 месяц после введения вакцины ($41,20 \pm 5,12$ против $26,58 \pm 3,43$ мкг/мл, $p < 0,05$) со снижением его уровня через 6 месяцев после вакцинации ($31,82 \pm 3,89$ мкг/мл) с достоверным ростом значений через 18 месяцев ($62,16 \pm 7,35$ мкг/мл, $p < 0,01$).

При оценке уровня IgM к капсульному ПС *H. influenzae* типа b, отмечено нарастание синтеза IgM через 1 месяц после вакцинации

Таблица 3. Уровни IgG в сыворотках крови к полисахаридам, входящим в состав вакцины «Пневмо-23» и к ПС различных серотипов *S. pneumoniae* у детей с ХБЛП после вакцинации пневмококковой вакциной

Table 3. The levels of IgG in the sera to the polysaccharides included of the vaccine Pneumo-23 and to the polysaccharides of different serotypes of *S. pneumoniae* in children with chronic bronchopulmonary pathology after vaccination with pneumococcal vaccine

ПС различных серотипов <i>S. pneumoniae</i> The polysaccharides of different serotypes of <i>S. pneumoniae</i>	Уровни IgG (у.е./мл) (M±m) The levels of IgG (conditional unit/ml) (M±m)			
	До вакцинации Before vaccination n = 23	Через 1 мес. после вакцинации 1 month after vaccination n = 23	Через 6 мес. после вакцинации 6 months after vaccination n = 17	Через 18 мес. после вакцинации 18 months after vaccination n = 15
3	27,20±3,79	43,74±6,60*	60,45±9,27***	41,31±5,73
6В	46,38±5,24	75,46±11,47*	50,43±6,72	45,63±5,31
9N	41,52±4,59	65,18±10,31*	44,69±4,93	37,99±3,99
23F	33,39±3,32	51,50±6,42**	58,04±10,44*	46,89±4,58*
ПС, входящие в «Пневмо-23» The polysaccharides included of the vaccine Pneumo-23	28,61±3,97	72,51±16,40**	45,25±14,00	48,26±6,33*

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$; статистический анализ проводился между группами 1–2, 1–3, 1–4.
Note. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$; statistical analysis was carried out between groups 1–2, 1–3, 1–4.

(47,71±4,99 против 25,35±4,07 мкг/мл, $p < 0,002$), через 6 и 18 месяцев (47,59±5,48 мкг/мл, $p < 0,01$, и 63,30±9,46 мкг/мл, $p < 0,05$, соответственно).

При исследовании содержания уровней IgG, не было отмечено детей с полным отсутствием в сыворотке крови IgG к капсульному ПС и ПС клеточной стенки *H. influenzae* типа b. Вероятно, это обусловлено тем, что во всех исследуемых группах были носители как бескапсульных, так и капсульных штаммов *H. influenzae*, в том числе и *H. influenzae* типа b (табл. 5).

Следовательно, у детей с ХБЛП имеется персистенция капсульных и бескапсульных форм гемофильной инфекции на слизистых дыхательных путей, что объясняет наличие в сыворотках крови IgG к гемофильной палочке. Однако количественные показатели IgG к антигену капсульного ПС *H. influenzae* типа b у большинства обследованных детей довольно низкие, что недостаточно для осуществления эффективной защиты против инфекции, связанной с гемофильной палочкой.

В процессе вакцинации детей с ХБЛП препаратом «Акт-ХИБ» отмечено нарастание уровня IgG к ПС *H. influenzae* типа b через 1 месяц после введения вакцины (229,44±34,38 мкг/мл против 19,62±1,64 мкг/мл, $p < 0,001$) с сохранением высокого уровня значений через 6 месяцев (239,13±38,12 мкг/мл, $p < 0,001$), а также через 18 месяцев (94,14±24,31 мкг/мл, $p < 0,01$) соответственно.

Очевидно, снижение уровня антител к ПС клеточной стенки *H. influenzae* через 18 месяцев после вакцинации связано с достаточной выра-

боткой высокого уровня IgG к ПС гемофильной палочки типа b и снижением носительства непатогенных штаммов возбудителя.

Таким образом, вакцинация препаратом «Акт-ХИБ» детей с ХБЛП приводит к заметному нарастанию уровня IgG к ПС *H. influenzae* типа b в поствакцинальном периоде с сохранением высоких значений в течение 18 месяцев (срок исследования).

Так как однократное введение вакцин «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» детям с пороками развития легких и бронхиальной астмой приводит к нарастанию уровня IgG к ПС, входящим в состав вакцин, можно сделать вывод об их высокой иммуногенности у данного контингента детей.

Обсуждение

Проблема ХБЛП в педиатрии занимает одно из ведущих мест и ее актуальность все более возрастает, что обусловлено трудностью диагностики и лечения, тяжестью течения заболеваний и ранней инвалидизацией больных. Исследования последних десятилетий продемонстрировали, что *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа b являются ведущими патогенами в обострении ХБЛП у детей [1, 2, 4, 17, 18]. Важными направлениями в решении этой проблемы являются предупреждение болезней органов дыхания путем эффективной терапии острой патологии дыхательных путей, а также ранняя диагностика и адекватная терапия хронического процесса в легких, разработка новых

Таблица 4. Уровни IgM в сыворотках крови к полисахаридам клеточной стенки гемофильной палочки и к ПС *H. influenzae* типа b у детей с ХБЛП, вакцинированных препаратом «Акт-ХИБ»

Table 4. The levels of IgM in the sera to the polysaccharides of cell wall of *H. influenzae* and to the polysaccharides *H. influenzae* type b in group of children with chronic broncho-pulmonary pathology vaccinated by Act-Hib

Исследуемые АГ <i>H. influenzae</i> Antigens of <i>H. influenzae</i>	Уровни IgM (у.е./мл) (M±m) The levels of IgM (conditional unit/ml) (M±m)			
	До вакцинации Before vaccination n = 27	Через 1 мес. после вакцинации 1 month after vaccination n = 27	Через 6 мес. после вакцинации 6 month after vaccination n = 21	Через 18 мес. после вакцинации 18 month after vaccination n = 18
ПС (к клеточной стенке) The polysaccharides of cell wall of <i>H. influenzae</i>	26,58±3,43	41,20±5,12*	31,82±3,89	62,16±7,35****
ПС (к капсульному штамму <i>H. influenzae</i> тип b) The polysaccharides (to the capsule strains of <i>H. influenzae</i> type b)	25,35±4,07	47,71±4,99****	47,59±5,48**	63,30±9,46***

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,002$; статистический анализ проводился между группами 1–2, 1–3, 1–4.
Note. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,002$; statistical analysis was carried out between groups 1–2, 1–3, 1–4.

эффективных методов лечения и реабилитации больных. Основу базисной терапии ХВЗЛ составляют антибиотики, однако в последнее время, несмотря на расширение арсенала антибактериальных средств, во всем мире отмечается рост резистентности микроорганизмов к ним [15, 16]. Особенностью лечения больных с ХВЗЛ является необходимость частого применения антибиотиков и постоянной коррекции антибиотикотерапии, что связано с нарастающей резистентностью патогенной микрофлоры. Важное место занимает специфическая профилактика заражения основными патогенами с использованием вакцинных препаратов [6, 8, 12]. Для оценки эффективности проводимой иммунопрофилактики используется метод определения уровня антител в сыворотках крови у лиц, получивших вакцину. В нашем исследовании мы показали, как дети с ХБЛП отвечают выработкой антител на введение полисахаридных вакцин «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ».

Анализируя уровни IgM к ПС, входящим в состав вакцины, и к ПС различных серотипов *S. pneumoniae* через 1, 6 и 18 месяцев после вакцинации препаратом «Пневмо-23» детей с ХБЛП, отмечено, что через 1 месяц достоверный прирост уровня антител наблюдался к полисахариду 23F и к ПС, входящим в вакцину. Через 6 месяцев достоверного прироста мы не зафиксировали, однако через 18 месяцев после вакцинации уровни антител к серотипам 6В, 9N сохранялись высокими с достоверным увеличением показателей к серотипам 3, 23F, что связано, по всей вероятности, с формированием высокодозной им-

мунологической толерантности, так как пациенты были вакцинированы в течение 2–4 недель после перенесенного обострения. Обращает на себя внимание тот факт, что выработка антител на исследуемые серотипы пневмококка после вакцинации была сильнее к тем антигенам, уровень антител к которым до вакцинации был ниже по сравнению с уровнем антител к другим исследуемым серотипам.

Показано, что, несмотря на дисбаланс Т-клеточного звена иммунитета, дети с ХБЛП способны отвечать выработкой антител против пневмококковой и гемофильной инфекций. Введение вакцины «Пневмо-23» больным детям с ХБЛП сопровождалось синтезом IgG к ПС серотипов 3, 6В, 9N, 23F. Через 6 месяцев отмечено нарастание уровня антител к ПС 3 и 23F серотипов. Установлено, что через 18 месяцев сохраняются высокие титры антител к ПС, входящим в вакцину «Пневмо-23».

Оценивая иммунный эффект вакцинопрофилактики против гемофильной типа b инфекции у детей с ХБЛП препаратом «Акт-ХИБ», мы анализировали уровни IgM и IgG к ПС, входящим в вакцину к ПС *H. influenzae* до и спустя 1, 6 и 18 месяцев после вакцинации. Показано, что через 1, 6, 18 месяцев после введения препарата «Акт-ХИБ», отмечалось достоверное увеличение уровней IgM к ПС, входящим в вакцину.

В обследуемых группах не было отмечено детей с полным отсутствием в сыворотке крови IgG к капсульному полисахариду *H. influenzae* типа b и IgG к ПС клеточной стенки *H. influenzae*. Вероятно, это обусловлено тем, что и в группах

Таблица 5. Содержание IgG в сыворотках крови к полисахаридам клеточной стенки гемофильной палочки и к ПС *H. influenzae* типа b у детей с ХБЛП, вакцинированных препаратом «Акт-ХИБ»

Table 5. The content of IgG in the sera of the polysaccharides of the cell wall of *H. influenzae* and to the polysaccharides to *H. influenzae* type b in children with chronic broncho-pulmonary pathology vaccinated by Act-Hib

Исследуемые АГ <i>H. influenzae</i> Antigens of <i>H. influenzae</i>	Уровни IgG (у.е./мл) (M±m) The levels of IgG (conditional unit/ml) (M±m)			
	До вакцинации Before vaccination n = 27	Через 1 мес. после вакцинации 1 month after vaccination n = 27	Через 6 мес. после вакцинации 6 month after vaccination n = 21	Через 18 мес. после вакцинации 18 month after vaccination n = 18
ПС (к клеточной стенке) The polysaccharides of cell wall of <i>H. influenzae</i>	26,98±3,43	35,51±4,12	31,54±4,75	0,84±0,14**
ПС (к капсульному штамму <i>H. influenzae</i> тип b) The polysaccharides (to the capsule strains of <i>H. influenzae</i> type b)	19,62±1,64	229,44±34,38**	239,13±38,12**	94,14±24,31*

Примечание. *p < 0,01, ** p < 0,001; статистический анализ проводился между группами 1–2, 1–3, 1–4.

Note. *p < 0.01, ** p < 0.001; statistical analysis was carried out between groups 1–2, 1–3, 1–4.

детей с пороками развития легких и в группах детей с пороками развития легких в сочетании с бронхиальной астмой были носители как бескапсульных, так и капсульных штаммов *H. influenzae*, в том числе и *H. influenzae* типа b. Это подтверждается данными других авторов, полученными при посевах мокроты пациентов с патологией бронхолегочной системы [14, 17, 18].

В процессе вакцинации детей с ХБЛП препаратом «Акт-ХИБ» отмечено нарастание уровня IgG к полисахариду *H. influenzae* типа b через 1 месяц после введения вакцины ($229,44 \pm 34,38$ против $19,62 \pm 1,64$ мкг/мл, $p < 0,001$) с сохранением высокого титра через 6 и 18 месяцев ($239,13 \pm 38,12$ мкг/мл, $p < 0,001$, и $94,14 \pm 24,31$ мкг/мл, $p < 0,01$, соответственно).

Значительное снижение уровня IgG к ПС клеточной стенки *H. influenzae* отличных от типа b через 18 месяцев после вакцинации возможно связано с достаточной выработкой высокого титра специфических антител к полисахариду гемофильной палочки типа b и снижением носительства непатогенных штаммов возбудителя.

Следовательно, у детей с ХБЛП присутствуют бактерии, которые осуществляют процесс естественной иммунизации. Персистенция этих микроорганизмов на слизистых оболочках дыхательных путей в наблюдаемых группах, по-видимому, объясняет наличие у детей в сыворотках крови специфических IgG к гемофильной палочке. Однако количественные показатели IgG к антигену капсульного ПС *H. influenzae* типа b у большинства обследованных детей довольно низкие, что недостаточно для осуществления эффективной защиты против инфекции, связанной с гемофильной палочкой.

Таким образом, у детей с ХБЛП есть признаки сформировавшейся иммунологической толерантности вследствие большой распространенности штамма и/или неоднократной встречи макро- и микроорганизма при недостаточной выработке защитного уровня специфических антител. Показано, что вакцинация препаратами «Пневмо-23» и «Акт-ХИБ» детей с пороками развития легких в сочетании с бронхиальной астмой сопровождается активацией адаптивного иммунитета, проявляющейся синтезом IgM и IgG к вакцинным антигенам. Иммунологический ответ на вакцинацию против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций способствует не только профилактике указанным заболеваний, но и значительному улучшению в клиническом статусе больного, в связи с чем вакцинация считается приоритетным мероприятием в обеспечении качества жизни пациентов с ХБЛП [2, 6, 16].

Заключение

Введение вакцин против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций пациентам с пороками развития легких, бронхиальной астмой и их сочетанием вне периода обострения заболевания, независимо от ее стадии, сопровождается синтезом специфических антител

Вакцинация против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций должна быть включена в стандарты ведения больных с пороками развития бронхов и легких, пороками развития бронхов и легких в сочетании с бронхиальной астмой и больных бронхиальной астмой.

Вакцинировать таких пациентов следует в кратчайшие сроки после постановки диагноза.

Список литературы/References

1. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Маянский Н.А., Куличенко Т.В., Полунина Т.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., Пономаренко О.А., Колтунов И.Е., Иваненко А.М., Дегтярева Е.А., Кондратенко Н.В., Корсунский А.А., Константинов К.В., Тулупов Д.А., Лазарева М.А. Роль *Streptococcus pneumoniae* в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011–2012 гг. // Педиатрическая фармакология. 2013. Т. 10, № 5. С. 6–12. [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Mayanskii N.A., Kulichenko T.V., Polunina T.A., Lazareva A.V., Aljab'eva N.M., Katosova L.K., Ponomarenko O.A., Koltunov I.E., Ivanenko A.M., Degtjarjova E.A., Kondratenko N.V., Korsunskij A.A., Konstantinov K.V., Tulupov D.A., Lazareva M.A. Role of *Streptococcus pneumoniae* in the structure of bacterial infections in the children hospitalized to inpatient hospitals in Moscow in 2011–2012. *Pediatricheskaja farmakologija = Pediatric Pharmacology*. 2013, vol. 10, no. 5, pp. 6–12. doi: 10.15690/pf.v10i5.816 (In Russ.)]
2. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнева Е.А., Федосеенко М.В., Селимзянова Л.Р., Брико Н.И., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Костинов М.П., Королева И.С., Козлов Р.С. Вакцинопрофилактика гемофильной инфекции типа b у детей // Болезни детского возраста от А до Я. Руководство для врачей. Вып. 12. Москва: ПедиатрЪ, 2016. 32 с. [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatochenko V.K., Vishneva E.A., Fedoseenko M.V., Selimzjanova L.R., Briko N.I., Lobzin Ju.V., Harit S.M., Kostinov M.P., Koroleva I.S., Kozlov R.S. Vaccinal prevention of a hemophilic infection b at children. *Diseases of childhood from A to Z: Guide for physicians*. Iss. 12. *Moscow: Pediatr*, 2016. 32 p. (In Russ.)]
3. Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Блинова С.М. Динамика антибиотикорезистентности у *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, вызывающих ЛОР-патологию и бронхолегочные заболевания детей на среднем Урале // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 2. С. 168–175. [Boronina L.G., Samatova E.V., Blinova S.M. Changes in antimicrobial resistance in clinical pediatric isolates of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* in Middle Ural area. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 168–175. (In Russ.)]

4. Брико Н.И., Намазова-Баранова Л.С., Костинов М.П., Симонова Е.Г., Федосеенко М.В. Эпидемиология, клиника и профилактика пневмококковой инфекции. Учебное пособие для врачей. Москва, 2017. 112 с. [Briko N.I., Namazova-Baranova L.S., Kostinov M.P., Simonova E.G., Fedoseenko M.V. Epidemiology, clinical features and prevention of pneumococcal infection. Study guide for physicians. Moscow, 2017. 112 p. (In Russ.)]
5. Вакцины и вакцинация: Национальное руководство (крат. изд-е). Под ред. Зверев В.В., Хаитов Р.М. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. С. 100–145. [Vaccines and vaccination: National guidelines. Eds.: Zverev V.V., Haitov R.M. Moscow: GEOTAR-Media, 2014, pp. 100–145. (In Russ.)]
6. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья: практическое руководство для врачей. 4-е изд. М.: Медицина для всех, 2013. 432 с. [Kostinov M.P. Vaccination of children with the broken state of health: practical guidance for doctors. Moscow: Medicine for all, 2013. 432 p. (In Russ.)]
7. Магаршак О.О., Костинов М.П., Краковская А.В., Козлов В.К., Благовидов Д.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., Костинов А.М. Клиническая эффективность вакцинации против гемофильной инфекции типа b и пневмококковой инфекции у детей с хронической патологией органов дыхания // Педиатрия. 2018. Т. 2, № 97. С. 122–129. [Magarshak O.O., Kostinov M.P., Krakovskaya A.V., Kozlov V.K., Blagovidov D.A., Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Kostinov A.M. Clinical efficacy of vaccination against hemophilic type b and pneumococcal infections in children with chronic respiratory diseases. *Pediatrija = Pediatrics*, vol. 2, no. 97, pp. 122–129. doi: 10.24110/0031-403X-2018-97-2-122-129 (In Russ.)]
8. Патент № 2252784 Российская Федерация, МПК А 61 К 39/09, А 61 Р 37/00. Способ профилактики обострений хронических воспалительных заболеваний легких у детей: № 2003137667/14; заявлено 2003.12.29; опубликовано 27.05.2005 / Костинов М.П., Катосова Л.К., Рыжов А.А., Волков И.К. Патентообладатели: НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Научный центр здоровья детей РАМН. 9 с. [Patent No. 2252784 Russian Federation, Int. Cl. A 61 K 39/09, A 61 P 37/00. Method for preventing exacerbations of chronic inflammatory pulmonary diseases in children. No. 2003137667/14; application: 2003.12.29; date of publication 27.05.2005 / Kostinov M.P., Katosova L.K., Ryzhov A.A., Volkov I.K. Proprietors: NII vaktsin i syvorotok im. I.I. Mechnikova RAMN, Nauchnyj tsentr zdorov'ja detej RAMN. 9 p.]
9. Патент № 2331074 Российская Федерация, МПК G01N 33/569 (2006.01). Способ определения наличия поствакцинального иммунитета к антигенам вакцины «Пневмо-23»: № 2006133785/15; заявлено 2006.09.22; опубликовано 2008.08.10 / Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е., Костинов М.П. Патентообладатель: ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова. 5 с. [Patent No. 2331074 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01). Method of postvaccinal immunity to vaccine «Pneumo-23» antigen test. No. 2006133785/15; application: 2006.09.22; date of publication 2008.08.10 / Vaneeva N.P., Jastrebova N.E., Kostinov M.P. Proprietors: Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchnoissledovatel'skij institut vaktsiny i syvorotok im. I.I. Mechnikova (GU NIIVS im. I.I. Mechnikova). 5 p.]
10. Патент № 2331075 Российская Федерация, МПК G01N 33/569 (2006.01). Способ определения антител к капсульному полисахариду *Haemophilus influenzae* типа b: № 2006133787/15; заявлено 2006.09.22; опубликовано 27.03.2008 / Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Маркина О.А., Орлова О.Е., Елкина С.И., Костинов М.П., Апарин П.Г., Львов В.Л. Патентообладатель: ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова. 7 с. [Patent No. 2331075 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01) Method of antibodies test to capsular polysaccharide *Haemophilus influenzae* type b. No. 2006133787/15; application: 2006.09.22; date of publication 27.03.2008 / Jastrebova N.E., Vaneeva N.P., Markina O.A., Orlova O.E., Elkina S.I., Kostinov M.P., Aparin P.G., L'vov V.L. Proprietors: Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchnoissledovatel'skij institut vaktsiny i syvorotok im. I.I. Mechnikova (GU NIIVS im. I.I. Mechnikova). 7 p.]
11. Протасов А.Д., Жестков А.В., Лаврентьева Н.Е., Костинов М.П., Рыжов А.А. Эффект комплексной вакцинации против пневмококковой, гемофильной типа b инфекций и гриппа у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. Т. 4. С. 80–84. [Protasov A.D., Zhestkov A.V., Lavrentyeva N.Ye. Kostinov M.P., Ryzhov A.A. effect of complex vaccination against pneumococcal, hemophilic type b infections and influenza in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, vol. 4, pp. 80–84. (In Russ.)]
12. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. 2-е изд. Под ред. Костинова М.П., Чучалина А.Г. М.: Группа МДВ, 2018. 304 с. [Guide to clinical immunology in respiratory medicine. 2nd ed. Eds.: Kostinov M.P., Chuchalin A.G. Moscow: Gruppya MDV, 2018. 304 p. (In Russ.)]
13. Саматова Е.В. Особенности микробиоценоза нижних дыхательных путей при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях легких детей и антибиотикорезистентность основных патогенов // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. Т. 38, № 1. С. 45–50. [Samatova E.V. Microbiocenosis characteristics of the low respiratory tract at chronic infectious-inflammatory pulmonary diseases in children and antibiotic resistance of basic pathogens. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki = Herald of the Ural Medical Academic*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 45–50. (In Russ.)]
14. Сизоненко А.Л., Бениова С.Н., Костинов М.П., Маркелова Е.В., Таранова С.В. Иммунологический эффект вакцинации «Пневмо 23» детей с носительством *Streptococcus pneumoniae* // Медицинская иммунология. 2009. Т. 11, № 2–3. С. 289–292. [Sizonenko A.L., Beniova S.N., Kostinov M.P., Markelova E.V., Taranova S.V. Immunological effect produced by vaccination wit «Pneumo 23» of children with carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, vol. 11, no. 2–3, pp. 289–292. doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-289-292 (In Russ.)]
15. Чучалин А.Г. Затяжная пневмония // Пульмонология. 2014. № 3. С. 5–14. [Chuchalin A.G. Slowly-resolving pneumonia. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2014, no. 3, pp. 5–14. doi: 10.18093/0869-0189-2014-0-3-5-14 (In Russ.)]
16. Чучалин А.Г., Биличенко Т.И., Осипова Г.Л., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б., Костинов М.П. Вакцинопрофилактика болезней органов дыхания в рамках первичной медико-санитарной помощи населению. Клинические рекомендации // Пульмонология. Приложение. 2015. Т. 2, № 25. С. 1–19. [Chuchalin A.G., Belichenko T.I., Osipova G.L., Kurbatova E.A., Egorova N.B., Kostinov M.P. Vaccine prophylaxis of respiratory diseases in the framework of primary health care. Clinical guidelines. *Pulmonology*, 2015, vol. 2, no. 25, pp. 1–19. (In Russ.)]

17. Park D.E., Baggett H.C., Howie S.R.C., Shi Q., Watson N.L., Brooks W.A., Deloria Knoll M., Hammitt L.L., Kotloff K.L., Levine O.S., Madhi S.A., Murdoch D.R., O'Brien K.L., Scott J.A.G., Thea D.M., Ahmed D., Antonio M., Baillie V.L., DeLuca A.N., Driscoll A.J., Fu W., Gitahi C.W., Olotunde E., Higdon M.M., Hossain L., Karron R.A., Maiga A.A., Maloney S.A., Moore D.P., Morpeth S.C., Mwaba J., Mwenchanya M., Prosperi C., Sylla M., Thamthitawat S., Zeger S.L., Feikin D.R.; PERCH Study Group. Colonization density of the upper respiratory tract as a predictor of pneumonia — *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pneumocystis jirovecii*. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 15, no. 64 (suppl. 3), pp. S328–S336. doi: 10.1093/cid/cix104
18. Zhang Y., Zhang F., Wang H., Zhao C., Wang Z., Cao B., Du Y., Feng X., Hu Y., Hu B., Ji P., Liu Z., Liu Y., Liao W., Lu J., Sun H., Wang Z., Xu X., Xu X., Yang Q., Yu Y., Zhang R., Zhuo C. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from community-acquired respiratory tract infections in China: results from the CARTIPS antimicrobial surveillance program. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2016, vol. 5, pp. 36–41. doi: 10.1016/j.jgar.2016.03.002

Авторы:

Коровкина Е.С., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Краковская А.В., к.м.н., младший научный сотрудник ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии органов дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия;

Костинов М.П., д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Козлов В.К., член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии органов дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия;

Ястребова Н.Е., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунохимической диагностики ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Магаршак О.О., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Полищук В.Б., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Korovkina E.S., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Krakovskaya A.V., PhD (Medicine), Junior Researcher, Far-Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration — Research Institute of Motherhood and Childhood Protection, Khabarovsk, 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 of the Department of Epidemiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Kozlov V.K., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Far-Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration — Research Institute of Motherhood and Childhood Protection, Khabarovsk, Russian Federation;

Jastrebova N.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunochemical Diagnostics, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Magarshak O.O., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Polishchuk V.B., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.04.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 16.09.2019

Received 04.04.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 16.09.2019

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ мРНК ОСНОВНЫХ УЧАСТНИКОВ СИГНАЛИНГА АПОПТОЗА И ВЫЖИВАНИЯ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ВЭБ-ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Н.А. Сахарнов, О.В. Уткин, Е.Н. Филатова, Д.И. Князев, Н.Б. Преснякова

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

Резюме. Острый ВЭБ-ассоциированный мононуклеоз развивается преимущественно у детей и у пациентов с функциональными нарушениями иммунитета. Последствием перенесенной инфекции могут быть развитие вторичной иммунной недостаточности, новообразований, различные нарушения клеточных иммунных реакций. Несмотря на активное изучение молекулярных механизмов ВЭБ-инфекции, необходим поиск новых молекулярно-генетических факторов патогенеза ВЭБ-опосредованного мононуклеоза и ВЭБ-ассоциированной злокачественной трансформации клеток, которые могут быть использованы в клинической практике для мониторинга течения инфекции и в качестве предиктивных показателей риска развития ВЭБ-ассоциированных осложнений в виде иммунодефицита и новообразований. В настоящей работе был проведен комплексный полуквантитативный анализ экспрессии мРНК основных участников сигналинга апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом и в период реконвалесценции с помощью разработанных нами сплайсинг-ориентированных ДНК-микрочипов. Такие микрочипы позволяли оценивать как суммарную экспрессию генов (маркированных знаком — Σ), так и отдельных транскриптов, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Показано, что баланс уровней мРНК в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза смещался в сторону повышения экспрессии антиапоптотических факторов и элементов NF- κ B-зависимого сигналинга выживания, что может существенно усиливать резистентность клеток к апоптозу. Литературными данными подтверждались ВЭБ-ассоциированные изменения некоторых факторов (BIM/BCL2L1- Σ , PUMA/BBC3-NM_001127241, BID- Σ , CASP3- Σ , NFKB1- Σ , RELA- Σ). Также нами были обнаружены изменения уровней кодирующих и некодирующих транскриптов, ВЭБ-ассоциированный характер которых не описан в литературе (DCR1/TNFRSF10C-NM_003841, DR5/TNFRSF10B-NR_027140, CASP6 beta/CASP6-NM_032992, CASP7-NM_033338). Функциональные свойства данных молекул позволяют предположить их важную роль в патогенезе ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. В фазе реконвалесценции на фоне отсутствия клинических признаков заболевания уровни экспрессии некоторых мРНК оставались измененными по сравнению со здоровыми донорами (например, DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, CASP8- Σ , CASP3- Σ , BIM/BCL2L1- Σ , BCL2-NM_000633, MCL1- Σ , BCL-W/BCL2L2- Σ , BCL-XL/BCL2L1-NM_138578,

Адрес для переписки:

Сахарнов Николай Александрович
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. акад. И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.); 8 950 624-87-12 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: saharinov@nniem.ru; saharinov_n@mail.ru

Contacts:

Nikolai A. Sakharnov
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Blokhina Scientific Research Institute of
Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office); +7 950 624-87-12 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: saharinov@nniem.ru; saharinov_n@mail.ru

Библиографическое описание:

Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Князев Д.И., Преснякова Н.Б.
Анализ экспрессии мРНК основных участников сигналинга апоптоза
и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным
мононуклеозом // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 723–734.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-723-734

Citation:

Sakharnov N.A., Utkin O.V., Filatova E.N., Knyazev D.I., Presnyakova N.B.
Apoptosis- and survival-related gene mRNA profile in peripheral blood
leukocytes in children with acute EBV infectious mononucleosis // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 5–6, pp. 723–734. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-723-734

BIRC2-NM_001166, XIAP-NM_001167, TRAF2-NM_021138, MAP3K14- Σ , NFKB1- Σ), что может указывать на наличие отдаленных молекулярных последствий ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. Данные изменения могут обуславливаться, с одной стороны, пролонгированным иммунным ответом на инфекцию, а с другой стороны, происходить под влиянием ВЭБ-ассоциированных факторов, облегчающих персистенцию вируса в организме. В целом выявленные нами молекулярные особенности течения заболевания указывают на формирование предпосылок для хронизации инфекционного процесса. Полученные данные расширяют существующие представления о молекулярных механизмах патогенеза ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

Ключевые слова: ВЭБ-инфекционный мононуклеоз, лейкоциты, уровни экспрессии мРНК, сигнальные пути апоптоза и выживания.

APOPTOSIS- AND SURVIVAL-RELATED GENE mRNA PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE EBV INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Sakharnov N.A., Utkin O.V., Filatova E.N., Knyazev D.I., Presnyakova N.B.

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

Abstract. Acute EBV-associated mononucleosis develops mainly in children and in patients with functionally impaired immune system. Consequently, it may result in developing secondary immunodeficiency, neoplasms as well as diverse alterations in cell-mediated immune reaction. Despite extensively examining molecular mechanisms of EBV infection, it is also necessary seek for new molecular and genetic factors underlying pathogenesis of EBV-mediated mononucleosis and EBV-associated malignant cell transformation is necessary, which might be used in clinical practice to monitor clinical score as well as predictive parameters for EBV-associated complications such as immunocompromised conditions and neoplasms. Here, we proposed to use our splicing sensitive DNA microarrays to perform a comprehensive semi-quantitative mRNA expression analysis for major apoptosis- and survival-related signaling components in peripheral blood leukocytes collected from children with acute EBV infectious mononucleosis as well as during recovery period. Using such DNA microchips allowed to assess both total (denoted by Σ) and separate transcript expression resulting from alternative splicing. It was shown that the balance of mRNA levels in acute phase of EBV-infectious mononucleosis was shifted towards upregulated expression of anti-apoptotic factors and components of NF- κ B-linked pro-survival signaling able to profoundly augment apoptosis resistance. Moreover, some EBV-associated changes (BIM/BCL2L11- Σ , PUMA/BBC3-NM_001127241, BID- Σ , CASP3- Σ , NFKB1- Σ , RELA- Σ) were in agreement with the data published before. In addition, we also found previously unknown changes in level of EBV-associated coding and noncoding transcripts (DCR1/TNFRSF10C-NM_003841, DR5/TNFRSF10B-NR_027140, CASP6 beta/CASP6-NM_032992, CASP7-NM_033338). Analyzing their properties allowed to suggest that they play an important role in the pathogenesis of EBV-associated mononucleosis. However, at asymptomatic recovery stage, level of some mRNA expression was kept altered compared to healthy volunteers (DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, CASP8- Σ , CASP3- Σ , BIM/BCL2L11- Σ , BCL2-NM_000633, MCL1- Σ , BCL-W/BCL2L2- Σ , BCL-XL/BCL2L1-NM_138578, BIRC2-NM_001166, XIAP-NM_001167, TRAF2-NM_021138, MAP3K14- Σ , NFKB1- Σ), which may point at postponed EBV-associated molecular consequences. On one hand, such changes may be due to long-lasting anti-EBV immune response, whereas, on the other hand, they might be influenced by EBV-associated factors facilitating virus persistence. Overall, we identified the molecular features predisposing to chronic course of EBV-infection. The data obtained further expand our understanding about the molecular pathogenetic mechanisms for EBV infectious mononucleosis.

Key words: EBV-infectious mononucleosis, leukocytes, mRNA expression levels, apoptotic and survival pathways.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) — широко распространенный лимфотропный герпесвирус человека, носителями которого являются более 90% мирового населения. В большинстве случаев первичная ВЭБ-инфекция протекает бессимптомно. Острый ВЭБ-ассоциированный мононуклеоз развивается преимущественно у детей и у пациентов с функциональными нарушениями иммунитета. ВЭБ сохраняется в организме пожизненно в фазе латенции. Последствием перенесенной инфекции могут быть развитие вторичной иммунной недостаточности и различные нарушения клеточных иммунных реакций [2].

ВЭБ инфицирует преимущественно В-лимфоциты, а также Т-лимфоциты, натуральные киллеры и другие клетки [6].

При определенных условиях ВЭБ может инициировать развитие В-, Т- и НК-клеточных лимфом, а также других новообразований [17, 26, 51].

Ежегодно в мире регистрируется около 200 тыс. случаев онкологических заболеваний, этиологическим фактором которых является ВЭБ [13].

Несмотря на активное изучение молекулярных механизмов ВЭБ-инфекции, до сих пор не разработаны эффективные таргетные методы терапии, а также специфические ВЭБ-ориентированные вакцины. Необходим поиск

молекулярно-генетических факторов патогенеза ВЭБ-опосредованного мононуклеоза и ВЭБ-ассоциированной злокачественной трансформации клеток, которые могут быть использованы в клинической практике для мониторинга течения инфекции и в качестве предиктивных показателей риска развития ВЭБ-ассоциированных осложнений в виде иммунодефицита, новообразований и др. [49].

Известно, что продукты генома ВЭБ способны ингибировать сигнальные пути апоптоза, обеспечивая экранирование инфицированных клеток от воздействия иммунного ответа [22, 45].

Модуляция активности апоптоз-ассоциированных сигнальных путей осуществляется, в том числе, через регуляцию транскрипции, например, изменения уровней мРНК, кодирующих про- и антиапоптотические факторы [43].

Необходимо отметить, что с помощью альтернативного сплайсинга пре-мРНК из одного гена могут образовываться транскрипты, кодирующие белки с различными свойствами или функциями (вплоть до антагонистических), а также выполняющие регуляторную роль (например, не кодирующие транскрипты) [5, 34].

ВЭБ-ассоциированные изменения уровней мРНК основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания могут являться важными факторами патогенеза ВЭБ-инфекции.

Для комплексного анализа большого количества гетерогенных мРНК традиционные методы исследования (ОТ-ПЦР и его различные варианты) являются трудоемкими и финансово затратными. Одним из возможных инструментов для решения таких задач являются сплайсинг-чувствительные ДНК-микрочипы, которые позволяют провести одновременную детекцию и полуколичественный анализ нескольких тысяч транскриптов [30].

Целью данной работы явилась оценка экспрессии генов сигналинга апоптоза и выживания в рамках изучения молекулярных особенностей патогенеза ВЭБ-инфекции. Для этого с помощью разработанных нами ДНК-микрочипов был проведен полуколичественный анализ экспрессии мРНК основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом и в период реконвалесценции.

Материалы и методы

Материалом исследования явились образцы лейкоцитов крови, полученные от пациентов в возрасте 7–17 лет с диагнозом «Первичный острый ВЭБ-инфекционный мононуклеоз» (ВЭБ, n = 18) и в фазе реконвалесценции после исчезновения клинических признаков заболевания (повторный забор биоматериала осуществлялся через 2–2,5 месяца) (РЕК, n = 18). В качестве группы сравнения выступали практически

здоровые доноры сопоставимого пола и возраста без клинических и лабораторных признаков заболевания (НОРМ, n = 51).

Дизайн микрочипа. С помощью разработанного нами ранее алгоритма «Splice variants microarray design pipeline» [46] были выбраны последовательности ДНК-зондов, специфичных для индивидуальных мРНК 450 генов сигналинга апоптоза и выживания.

Дизайн микрочипа моделировался на основе кодирующих (NM_Protein-coding) и не кодирующих (NR_Non-protein-coding) последовательностей мРНК, аннотированных в базе данных RefSeq NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>). Из-за высокой степени сходства между индивидуальными мРНК в рамках одного гена явилось невозможным подобрать последовательности зондов, специфичные для каждой из них. Поэтому были дополнительно выбраны последовательности групповых зондов, специфичных для последовательностей более 70% транскриптов гена (маркированы в тексте статьи знаком — Σ). Групповые ДНК-зонды использовались для оценки суммарной экспрессии генов. Разработанный микрочип содержит 1180 ДНК-зондов, детектирующих индивидуальные мРНК, и 367 групповых ДНК-зондов. Синтез ДНК-зондов был проведен на слайдах 12K microarray *in situ* с помощью аппарата V3 Synthesizer (CustomArray Inc., WA, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Пробоподготовка образцов мРНК для гибридизации на микрочип. Образцы крови обрабатывались раствором «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия) для удаления эритроцитов. Из полученной фракции лейкоцитов выделялась тотальная РНК с помощью набора «Магно-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) с последующей очисткой и концентрацией с помощью фенол-хлороформа. Тотальная мРНК (1,5–2 мкг) подвергалась обратной транскрипции и достройке второй цепи кДНК с помощью набора «Mint cDNA synthesis kit» (Евроген, Россия). Полученная двуцепочечная кДНК амплифицировалась в ходе ПЦР с помощью набора «Encyclo» (Евроген, Россия) по программе (95°C 25 с — 60°C 25 с — 72°C 6 мин). Амплифицированная кДНК (2 мкг) подвергалась транскрипции с помощью набора «T7 RNA-polymerase» (Thermo Scientific, EU). Половина количества уридинтрифосфатов (УТР) в реакционной смеси была заменена на биотинилированные уридинтрифосфаты (ДНК-синтез, Россия), в результате получали пул биотин-меченой РНК, обратно комплементарной мРНК исследуемого образца. Фрагментированная биотин-меченая РНК (2 мкг) гибридизовалась на микрочипы при 40°C в течение 18–20 ч. Процессинг микрочипов (блокирование, мечение, отмывка и внесение субстрата) выполнялся с помощью набора «ElectraSense Detection Kit» (CustomArray Inc., США) в соответствии с протоколом про-

изготовителя. Считывание сигналов гибридизации проводилось амперометрическим методом с помощью «ElectraSense Reader» и программы ElectraSense application software (CustomArray Inc., США).

Алгоритм обработки данных. Полуколичественный анализ уровней экспрессии мРНК проводился по следующему алгоритму: каждый исследуемый образец мРНК был гибридизован на микрочип в трех повторностях. Полученные сигналы гибридизации в виде .esd файлов были экспортированы в csv. файлы с помощью программы ElectraSense Analysis 3.4.2. Все расчеты проводились в свободно распространяемых средах программирования Python или R. Данные были нормализованы с помощью алгоритма квантильной нормализации по неспецифическому контролю [50].

Для измерения относительного уровня экспрессии мРНК (FC/fold-change) использовались средние значения уровней сигналов гибридизации каждого ДНК-зонда в отдельных выборках образцов ВЭБ, РЕК и НОРМ. Далее проводились сравнения средних значений сигналов в выборках ВЭБ/НОРМ и РЕК/НОРМ с использованием Т-теста с поправкой на ожидаемую долю ложных отклонений (FDR/False discovery rate test) [36]. В качестве порогового уровня значимости был выбран $q = 0,05$.

Относительный уровень экспрессии мРНК (fold-change/FC) рассчитывался по формулам:

$$FC \text{ ВЭБ}\% = (\text{сред. ВЭБ} \times 100 / \text{сред. НОРМ}) - 100;$$

$$FC \text{ РЕК}\% = (\text{сред. РЕК} \times 100 / \text{сред. НОРМ}) - 100.$$

По данным литературы [36] известно, что для более объективного анализа экспрессии мРНК методом ДНК-микрочипов необходимо учитывать не только статистически значимые различия сигналов, но и ранжировать их по диапазону изменения, эмпирически определяя функциональный пороговый уровень. Учитывая то, что нами изучалась экспрессия мРНК, регулирующих базовые физиологические процессы в пуле лейкоцитов крови, состоящих из различных субпопуляций клеток, а также сравнивались средние показатели в выборках образцов, ожидаемый диапазон изменений уровней мРНК не является большим. В связи с этим, а также исходя из диапазона полученных нами данных, был выбран пороговый уровень изменений сигналов $FC \pm 10\%$.

Таким образом, критериями для отбора новых, не охарактеризованных ранее факторов патогенеза ВЭБ-опосредованного мононуклеоза являлись: статистическая значимость изменений уровней мРНК ($q < 0,05$), диапазон их вариации $FC \pm 10\%$, подтверждение ВЭБ-ассоциированного характера уровней экспрессии исследуемых транскриптов в литературе (по возможности).

Результаты

Анализируемые мРНК были сгруппированы нами по их функциональной роли в сигнальных каскадах апоптоза и выживания. Оценивались изменения уровней экспрессии мРНК элементов апоптотического мембранного комплекса DISC (Death inducing signaling complex), митохондриального пути апоптоза, эффекторных каспаз и NF-κB-опосредованного сигналинга выживания.

Изменения уровней экспрессии мРНК элементов апоптотического мембранного комплекса DISC

В острой фазе заболевания выявлялось существенное снижение суммарной экспрессии генов, а также уровней индивидуальных мРНК проапоптотических факторов мембранного комплекса смерти DISC: лиганда смерти TRAIL/TNFSF10-NM_003810, рецептора смерти DR5/TNFRSF10B-Σ, медиатора FADD-NM_003824 и инициаторной каспазы CASP8-Σ (табл. 1).

С другой стороны, в острой фазе заболевания детектировалось значительное повышение уровней экспрессии мРНК некоторых факторов, ингибирующих активацию DISC, — некодирующей мРНК рецептора смерти DR5/TNFRSF10B-NR_027140, рецепторов-ловушек TRAIL—DCR1/TNFRSF10C-NM_003841 и DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, а также ингибитора каспазы-8 — cFLIP/CFLAR-NM_001202516 (табл. 1).

В фазе реконвалесценции уровни экспрессии большинства перечисленных транскриптов нормализовались, но при этом оставались значительно сниженными уровни мРНК рецептора-ловушки DCR2/TNFRSF10D-NM_003840 и гена каспазы CASP8-Σ (табл. 1).

Изменения уровней экспрессии мРНК элементов митохондриального пути апоптоза

В острой фазе заболевания снижалась суммарная экспрессия генов, а также индивидуальных уровней мРНК ряда проапоптотических факторов митохондриального пути апоптоза: Puma/BBC3-NM_001127241, BAK1-Σ, BID-Σ и BIM/BCL2L11-Σ. В фазе реконвалесценции суммарный уровень экспрессии BIM/BCL2L11-Σ оставался значительно сниженным, уровни мРНК других проапоптотических факторов нормализовались (табл. 2).

В острой фазе заболевания снижалась суммарная экспрессия генов и уровня мРНК антиапоптотических митохондриальных факторов MCL1-Σ, BclW/BCL2L2-Σ и BCL2-NM_000633 соответственно. В то же время значительно возрастал уровень экспрессии мРНК антиапоптотического фактора BclXL/BCL2L1-NM_138578, который был сильно повышен и в фазе реконвалесценции. Также при реконвалесценции оставались сниженными уровни экспрессии мРНК

Таблица 1. Изменения уровней экспрессии мРНК генов комплекса DISC в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции
 Table 1. Changes of the mRNA expression levels of DISC complex genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal	Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Проапоптотические факторы комплекса DISC Pro-apoptotic factors of the DISC complex					
TRAIL/TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand/ TNFSF10-NM_003810	-25,028 q < 0,001	-5,965 q = 0,461	Death receptor 5/ TNFRSF10B-NR_027140	20,256 q = 0,025	22,791 q = 0,106
Death receptor 5/DR5/ TNFRSF10B-Σ	-14,148 q = 0,046	-9,863 q = 0,109	Decoy receptor 1/DCR1/ TNFRSF10C-NM_003841	20,715 q = 0,03	16,873 q = 0,213
FADD/FAS-Associated Death Domain Protein/ FADD-NM_003824	-27,629 q = 0,006	2,367 q = 0,788	Decoy receptor 2/DCR2/ TNFRSF10D-NM_003840	29,228 q = 0,007	26,948 q < 0,001
Caspase-8/CASP8-Σ	-19,433 q = 0,018	-15,97 q = 0,034	CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator/cFLIP/ CFLAR-NM_001202516	28,706 q < 0,001	9,999 q = 0,151

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.
 Note. Σ — is the total level of gene expression.

Таблица 2. Изменения уровней экспрессии мРНК генов митохондриального пути апоптоза и выживания в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции
 Table 2. Changes of the mRNA expression levels of mitochondrial signaling genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal	Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Проапоптотические факторы митохондриального пути апоптоза Pro-apoptotic factors of the mitochondrial apoptotic signaling					
BBC3/Bcl-2-Binding Component 3/Puma/ BBC3-NM_001127241	-23,494 q = 0,04	26,997 q = 0,409	Bcl-xL/ BCL2 Like 1/ BCL2L1-NM_138578	62,134 q = 0,004	62,496 q = 0,002
BAK/BCL2 Antagonist/ Killer 1/BAK1-Σ	-25,35 q = 0,018	-2,992 q = 0,745	B-Cell CLL/Lymphoma 2/ Apoptosis Regulator Bcl-2/ BCL2-NM_000633	-24,364 q < 0,001	-14,210 q = 0,017
BH3-Interacting Domain Death Agonist/BID-Σ	-20,756 q = 0,003	-1,452 q = 0,828	Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein Mcl-1/MCL1-Σ	-34,549 q = 0,005	-26,579 q = 0,018
BIM/Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death/ BCL2L11-Σ	-54,127 q < 0,001	-64,814 q < 0,001	Apoptosis Regulator BCLW/BCL2L2-Σ	-26,403 q = 0,004	-21,162 q = 0,024

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.
 Note. Σ — is the total level of gene expression.

Таблица 3. Изменения уровней экспрессии мРНК генов эффекторной фазы апоптоза в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции

Table 3. Changes of the mRNA expression levels of effector apoptotic genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Эффекторные каспазы Effector caspases		
<i>Caspase-3/CASP3-Σ</i>	-17,755, q = 0,037	-18,954, q = 0,009
<i>Caspase-7/CASP7-Σ</i>	-15,464, q = 0,002	-15,541, q = 0,001
<i>Caspase-7/CASP7-NM_033338</i>	-14,752, q = 0,04	-4,005, q = 0,404
<i>Caspase-6/CASP6 beta/CASP6-NM_032992</i>	18,067, q = 0,008	9,601, q = 0,138
Ингибиторы эффекторных каспаз Inhibitors of effector caspases		
<i>Vacuoliral IAP Repeat-Containing Protein 2/BIRC2-NM_001166</i>	22,713, q = 0,009	17,73, q = 0,029
<i>X-Linked Inhibitor Of Apoptosis/XIAP-NM_001167</i>	27,613, q = 0,047	18,903, q = 0,04

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.

Note. Σ — the total level of gene expression.

Таблица 4. Изменения уровней экспрессии мРНК генов NF-κB-сигналинга выживания в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции

Table 4. Changes of the mRNA expression levels of effector apoptotic and NF-κB survival genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Участники NF-κB-зависимого сигналинга выживания Participants in NF-κB-dependent survival signaling		
<i>TRAF2/TNF Receptor Associated Factor 2/TRAF2-NM_021138</i>	16,974, q = 0,043	14,388, q = 0,026
<i>NF-κappa-Beta-Inducing Kinase/NIK/MAP3K14-Σ</i>	22,927, q = 0,009	16,907, q = 0,011
<i>NEMO/I-κappa-B Kinase Subunit Gamma/IKKG-Σ</i>	25,903, q = 0,006	10,726, q = 0,235
<i>NFKB1/Nuclear Factor Kappa B Subunit 1/p50/NFKB1-Σ</i>	19,399, q = 0,01	16,632, q = 0,049
<i>RELA Proto-Oncogene, NF-κB Subunit/p65/RELA-Σ</i>	17,5807, q = 0,02	4,416, q = 0,290
<i>NFKB2/Nuclear Factor Kappa B Subunit 2/NFKB2-NM_001077494</i>	10,102, q = 0,044	5,356, q = 0,283
<i>RELB Proto-Oncogene, NF-κB Subunit/RELB-NM_006509</i>	14,251, q = 0,01	13,421, q = 0,012

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.

Note. Σ — the total level of gene expression.

других вышеназванных антиапоптотических факторов — BCL2-NM_000633, MCL1-Σ и BclW/BCL2L2-Σ (табл. 2). Отметим, что независимо от периода заболевания (острый или реконвалесценция) уровни экспрессии мРНК структурных элементов митохондриальной апоптосомы (в составе каспазы-9, цитохрома С и APAF-1) не изменялись.

Изменения уровней экспрессии мРНК эффекторных каспаз

В острой фазе заболевания детектировалось снижение суммарных и индивидуальных уровней экспрессии мРНК эффекторных каспаз CASP3-Σ, CASP7-Σ и CASP7-NM_033338. Одновременно с этим повышалась экспрессия транскрипта CASP6 beta/CASP6-NM_032992, кодирующего вариант каспазы-6, блокирующий передачу цитотоксического сигнала [33] (табл. 3).

Необходимо отметить, что в острой фазе заболевания нами наблюдалось повышение уровней экспрессии мРНК ингибиторов каспаз cIAP1/BIRC2-NM_001166 и XIAP-NM_001167, которые оставались повышенными и в фазе реконвалесценции. Также в период реконвалесценции оставались сниженными суммарные и индивидуальные уровни экспрессии мРНК эффекторных каспаз CASP3-Σ и CASP7-Σ, при этом нормализовались уровни мРНК CASP6-NM_032992 и CASP7-NM_033338 (табл. 3).

Изменения уровней экспрессии мРНК элементов NF-κB-опосредованного сигналинга

В острой фазе заболевания выявлялось повышение суммарных и индивидуальных уровней экспрессии мРНК элементов активации NF-κB-зависимого сигналинга: медиатора TRAF2-NM_021138, киназ NIK/MAP3K14-Σ и NEMO/IKBKG-Σ, а также участников NF-κB-опосредованного транскрипционного комплекса — p50/NFKB1-Σ, p65/RELA-Σ и RELB-NM_006509 (табл. 4).

В фазе реконвалесценции уровни экспрессии большинства мРНК оставались повышенными и нормализовались только суммарные уровни мРНК NEMO/IKBKG-Σ и p65/RELA-Σ (табл. 4).

Обсуждение

В целом полученные нами данные указывают на то, что в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза баланс уровней мРНК смещается в сторону снижения проапоптотических и повышения антиапоптотических транскриптов, а также элементов NF-κB-опосредованного сигналинга, что может играть существенную роль в повышении выживаемости клеток.

Литературными данными подтверждаются ВЭБ-ассоциированные изменения некоторых сигнальных факторов (BID-Σ [44], RELA-Σ [10, 11] и др.).

Также обнаружены изменения уровней кодирующих и некодирующих транскриптов, ВЭБ-ассоциированный характер которых не описан в литературе (CASP6 beta/CASP6-NM_032992, DR5/TNFRSF10B-NR_027140 и др.). Однако функциональные свойства таких молекул позволяют предположить их важную роль в патогенезе ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. В фазе реконвалесценции на фоне отсутствия клинических признаков заболевания уровни экспрессии некоторых мРНК оставались измененными по сравнению со здоровыми донорами (CASP3-Σ, BclW/BCL2L1-Σ, NFKB1-Σ и др.). Существует несколько возможных объяснений выявленной картины экспрессии. С одной стороны, они могут отражать особенности молекулярных механизмов пролонгированного восстановления функционального состояния иммунитета вследствие выраженных изменений уровней экспрессии целевых мРНК в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза. С другой стороны, альтерация картины экспрессии изучаемых мРНК у выздоравливающих пациентов может происходить на фоне продолжающегося влияния продуктов генома ВЭБ, наличие ДНК которого в исследуемых образцах лейкоцитов крови выявлялось нами в клинически не значимой концентрации по результатам ПЦР в реальном времени (данные ПЦР-анализа в статье не приведены). Например, по данным литературы под воздействием латентного белка ВЭБ LMP1 происходит активация NF-κB-зависимого сигналинга выживания [21, 23].

Нами в фазе реконвалесценции детектировалось повышение уровней мРНК факторов активации NF-κB-опосредованного сигналинга — TRAF2-NM_021138, NIK/MAP3K14-Σ, NFKB1-Σ, RELB-NM_006509. Таким образом, данные транскрипты могут являться важными звеньями в цепи факторов патогенеза ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

Помимо выявленных нами отдаленных молекулярных последствий данного заболевания аналогичная особенность его течения регистрируется, по данным литературы, и на клеточном уровне. Так, у детей 6–17 лет, показатели клинического анамнеза которых были сопоставимы с таковыми в нашей исследуемой группе пациентов, через 1,5–6 месяцев после манифестации ВЭБ-инфекционного мононуклеоза выявлялись существенные отклонения в содержании CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, свидетельствующие о формировании вторичного иммунодефицита. При этом у части пациентов сохранялось повышенным содержание CD45RA⁺RO45⁺ клеток, что указывало на продолжающийся иммунный ответ на инфекцию. В целом регистрируемые нами молекулярные и описанные в литературе клеточные особенности течения заболевания указывают на формирование предпосылок для хронизации инфекционного процесса [1].

Выделяют два основных сигнальных пути апоптоза клеток, к которым относят внешний, реализуемый при участии мембранных рецепторов смерти, и внутренний, митохондриальный путь. Оба пути приводят к активации ключевых эффекторов апоптоза — каспаз-3, -6 и -7, которые вызывают протеолиз широкого спектра структурных и функциональных белков клетки [4].

Формирование молекулярного комплекса DISC (death inducing signaling complex) является начальным этапом реализации внешнего сигнального пути апоптоза. В состав DISC входит тример одного из лигандов (FasL, TRAIL) и, соответственно, рецепторов смерти (Fas, DR4 или DR5), медиатор FADD (Fas-associated death domain) и инициаторная каспаза-8. DISC инициирует каскадную активацию эффекторных каспаз-3, -6, и -7, а также может протеолитически активировать митохондриальный фактор BID, который инициирует внутренний путь апоптоза. Ингибиторами DISC являются cFLIP/cFLAR (ингибитор каспазы-8) и рецепторы-ловушки DCR1 и DCR2, которые конкурируют с рецепторами смерти DR4 и DR5 за связывание лиганда TRAIL [3, 4].

В острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза нами впервые получены данные о снижении экспрессии мРНК проапоптотических факторов комплекса DISC — лиганда смерти TRAIL/TNFSF10-NM_003810, рецептора смерти DR5- Σ , медиатора FADD-NM_003824 и инициаторной каспазы CASP-8- Σ , что свидетельствует в пользу комплексного ингибирования TRAIL/DR5-опосредованного апоптоза уже на начальных этапах апоптотического сигналинга. Также на это указывает повышение уровней экспрессии мРНК рецепторов-ловушек TRAIL — DCR1/TNFSF10C-NM_003841 и DCR2/TNFSF10D-NM_003840 и ингибитора каспазы-8 — cFLIP/cFLAR-NM_001202516. Известно, что рецепторы-ловушки DCR1 и DCR2 экспрессируются на мембране клеток и являются функциональными антагонистами рецептора смерти DR5, конкурируя с ним за связывание лиганда TRAIL. Связывая лиганд, рецепторы-ловушки блокируют передачу апоптотического сигнала в клетку [52].

Фактор cFLIP/cFLAR обладает высоким сродством к каспазе-8 и блокирует ее рекрутирование в комплекс DISC, препятствуя инициации внешнего пути апоптоза [27].

Интересен факт повышения уровня некодирующей мРНК рецептора смерти DR5/TNFSF10B-NR_027140 на фоне снижения уровня суммарной экспрессии гена DR5- Σ , свидетельствующий об уменьшении количества кодирующих белок мРНК, что также рассматривается нами в качестве возможного механизма ингибирования пусковых событий DR5/TRAIL-опосредованного апоптоза [5].

Отметим, что повышение уровня мРНК DCR2/TNFSF10D-NM_003840 и снижение суммарного уровня экспрессии гена CASP-8- Σ сохранялось и в период реконвалесценции, что также может вносить вклад в ингибирование TRAIL/DR5-опосредованного апоптоза.

По данным литературы рецептор смерти DR5 экспрессируется в широком спектре клеток, а сигнальные пути с участием TRAIL/DR5 играют важную роль в механизмах активации иммунных клеток и регуляции иммунного ответа [14, 28], а также в патогенетическом ингибировании апоптоза при различных вирусных заболеваниях (в частности, ВИЧ-инфекции [8] и гепатите В [18]). Рецепторы ловушки DCR1/TNFSF10C и DCR2/TNFSF10D также играют существенную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции [52].

Данные о ВЭБ-опосредованных изменениях уровней мРНК каспазы-8 и ее ингибитора cFLIP/cFLAR подтверждаются литературными данными. Так, резистентные к апоптозу ВЭБ-позитивные клеточные линии В-клеточной лимфомы Беркитта характеризовались повышенными уровнями экспрессии мРНК антиапоптотического фактора FLIP(L), а соотношение уровней мРНК каспазы-8 и FLIP(L) коррелировало с чувствительностью клеток к апоптозу [48].

Результаты, свидетельствующие об участии транскрипционного варианта cFLIP/cFLAR-NM_001202516 в патогенезе ВЭБ-инфекции в литературе отсутствуют, но с учетом данных, подтверждающих его антиапоптотическую активность [27], можно предположить, что данный транскрипт участвует в повышении выживаемости инфицированных клеток.

Внутренний путь апоптоза под влиянием различных факторов инициируется при снижении проницаемости митохондриальной мембраны. В результате в цитозоль проникают проапоптотические факторы Araf-1 и цитохром С, которые объединяются с прокаспазой-9 в сигнальный комплекс — апоптосому. В рамках апоптосомы инициируется протеолитическая активация эффекторных каспаз. Ключевую роль в регуляции проницаемости митохондриальной мембраны играют белки семейства Bcl-2. Проапоптотические факторы (BAX, BAK, BID, BAD, PUMA и др.) усиливают транспорт ионов и других молекул, снижая барьерный потенциал митохондрий, а антиапоптотические факторы (BCL-2, BCL-XL, Bcl-W, MCL-1 и др.) ингибируют этот процесс [3].

В пользу ингибирования митохондриального пути апоптоза в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза говорит выявленное нами на уровне генов и отдельных транскриптов снижение экспрессии проапоптотических факторов BAK1- Σ BID- Σ , BIM/BCL2L11- Σ и PUMA/BBC3-NM_001127241. По данным литературы в модуляции митохондриального пути апоптоза участвуют многие продукты генома ВЭБ. Так, экспрес-

сия проапоптотического фактора PUMA ингибируется посредством микро-РНК ВЭБ BART5 в клетках ВЭБ-опосредованной носоглоточной карциномы [12].

Экспрессия проапоптотического фактора BID ингибируется микро-РНК ВЭБ miR-BART4-5p в опухолевых клетках ВЭБ-ассоциированного рака желудка [44].

Также в ВЭБ-инфицированных В-клетках белки ВЭБ EBNA3A и EBNA3C координированно ингибируют экспрессию мРНК проапоптотического фактора BIM [7, 38].

Отметим, что в фазе реконвалесценции уровни большинства проапоптотических факторов нормализовались, за исключением фактора BIM, суммарная экспрессия которого оставалась сниженной, вероятно, вследствие продолжающегося воздействия белков ВЭБ EBNA3A и EBNA3C.

Среди антиапоптотических элементов митохондриального пути апоптоза в острой фазе ВЭБ-инфекционного моноклеоза наблюдалось выраженное повышение уровня мРНК BCL-XL/BCL2L1-NM_138578, сохраняющееся и в период реконвалесценции, что, на наш взгляд, вносит существенный вклад в повышение выживаемости клеток и их резистентности к апоптозу. В то же время выявлено снижение уровней мРНК ряда других антиапоптотических транскриптов (BCL2-NM_000633, MCL1- Σ , BCL-W/BCL2L2- Σ), которое наблюдалось как в острой фазе заболевания, так и в период реконвалесценции. Мы полагаем, что такая разнонаправленность изменений антиапоптотических факторов в структуре митохондриального сигналинга является отражением сложной картины антагонистических взаимодействий между влиянием ВЭБ, направленным на выживание инфицированных клеток, и эффекторами иммунного ответа, участвующими в элиминации патогена. В литературе описаны продукты генома ВЭБ, которые могут как активировать, так и ингибировать экспрессию антиапоптотических факторов митохондриального пути апоптоза. Так, белок ВЭБ BZLF1 способен ингибировать экспрессию антиапоптотических факторов BCL-2 и BclXL в CD4⁺ Т-клетках в ходе литической фазы ВЭБ-инфекции [22, 32, 54], а белок ВЭБ EBNA2 усиливает экспрессию антиапоптотических молекул BFL-1, BCL-XL, BCL-2 и MCL-1 в ходе пролиферации и иммортализации В-клеток [25, 31, 53].

В повышении уровня мРНК BCL-XL опосредованно участвует мембранный белок ВЭБ LMP2 (latent membrane protein 2), активируя транскрипционный фактор NF- κ B, а также элементы Активированного сигналинга [22, 39, 47], что приводит к повышению выживаемости клеток.

Острая фаза ВЭБ-инфекционного моноклеоза характеризовалась снижением уровней экспрессии мРНК CASP3- Σ , CASP7- Σ , что явно свидетельствует об ингибировании апоптотичес-

кого сигналинга в эффекторной стадии. Кроме того, нами впервые показано, что в острую фазу заболевания повышался уровень мРНК CASP6 beta/CASP6-NM_032992, которая ингибирует активность основного функционального варианта эффекторной каспазы-6 [33].

Следует отметить, что ингибированию терминальной стадии апоптотического сигналинга также способствует повышение уровней экспрессии мРНК ингибиторов каспаз — cIAP1/BIRC2 (BIRC2-NM_001166) и XIAP (XIAP-NM_001167).

Снижение уровней мРНК каспазы-3 и -7, и повышение экспрессии их ингибиторов cIAP и XIAP сохранялось и в фазе реконвалесценции при отсутствии клинических признаков заболевания, что может являться фактором, облегчающим переход ВЭБ в латентную стадию и более успешную персистенцию вируса в организме. ВЭБ-ассоциированное ингибирование экспрессии каспаз описано в литературе. Так, под влиянием ВЭБ-кодируемой микро-РНК группы BART происходит снижение экспрессии эффекторной каспазы-3 [24].

Острая фаза ВЭБ-инфекционного моноклеоза характеризовалась повышением уровней мРНК некоторых элементов NF- κ B-опосредованного сигналинга, направляющего клетки преимущественно по пути выживания и пролиферации. Так, синхронно повышались уровни мРНК ключевых медиаторов (TRAF2-NM_021138), активаторов (NIK/MAP3K14- Σ и NEMO/IKBKG- Σ) и эффекторов (NF- κ B1- Σ , RELA- Σ и RELB-NM_006509) данного сигналинга. ВЭБ-ассоциированная активация NF- κ B-зависимого сигналинга подтверждается данными литературы. Так, мембранный белок ВЭБ LMP1 (latent membrane protein 1) по структурно-функциональным особенностям сходен с активным рецептором смерти TNFR1, инициирующим NF- κ B-опосредованный сигналинг [9, 20, 21, 23, 40, 41].

Медиатор TRAF2 является ключевой мишенью для белка LMP1. Мутации или нокаут гена TRAF2 блокировали LMP1-опосредованную активацию NF- κ B [15, 16, 19, 29].

NIK/MAP3K14-опосредованная активация NF- κ B также инициируется при участии LMP1 [35].

Фактор NEMO/IKBKG (повышение уровня мРНК которого выявлялось нами в острой фазе заболевания) является важным активатором транскрипционного комплекса NF- κ B1 в составе RelA/p65+NF- κ B1/p50 [42].

ВЭБ-ассоциированная активация элементов транскрипционного комплекса NF- κ B1 описана в литературе на примере опухолевых линий. Так, в ВЭБ-трансформированных В-клетках при участии белка ВЭБ BARF1 повышалась экспрессия RELA, усиливающая пролиферацию инфицированных лимфоцитов [10, 11].

В то же время ВЭБ-опосредованное повышение уровней мРНК RELB наблюдалось при реактивации ВЭБ в клеточных линиях рака желудка [37].

В период реконвалесценции уровни мРНК ряда инициаторных (TRAF2-NM_021138, NIK/MAP3K14-Σ) и эффекторных (p50/NFKB1-Σ, RELB-NM_006509) элементов NF-κB-зависимого сигналинга оставались повышенными, что может быть обусловлено, с одной стороны, «остаточной» вирусиндуцированной активацией иммунокомпетентных клеток, которая, по данным литературы, может сохраняться на клеточном уровне длительное время после перенесенной инфекции [1], а с другой стороны, продолжением влияния ВЭБ-ассоциированных факторов, направленных на сохранение патогена в латентном состоянии.

Заключение

С помощью разработанных нами ДНК-микрочипов проведен комплексный полуквантитативный анализ экспрессии мРНК 450 генов — участников сигнальных каскадов апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей при остром ВЭБ-ассоциированном мононуклеозе и в период реконвалесценции. Дизайн ДНК-микрочипа позволял детектировать изменения, как суммарной экспрессии генов, так и уровней индивидуальных мРНК в рамках одного гена. Нами показано, что баланс уровней мРНК в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза смещался в сторо-

ну повышения экспрессии антиапоптотических факторов и элементов NF-κB-зависимого сигналинга выживания, что может существенно усиливать резистентность клеток к апоптозу. Уровни мРНК ряда элементов сигнальных путей апоптоза и выживания оставались альтерированными в период реконвалесценции в отсутствие клинических признаков заболевания, что может указывать на наличие отдаленных молекулярных последствий ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. Данные изменения могут обуславливаться, с одной стороны, пролонгированным иммунным ответом на инфекцию, а с другой стороны, происходить под влиянием ВЭБ-ассоциированных факторов, облегчающих персистенцию вируса в организме. Полученные данные расширяют существующие представления о молекулярных механизмах патогенеза ВЭБ-инфекционного мононуклеоза. Выявленные нами существенные изменения уровней экспрессии мРНК некоторых из изученных факторов дают основание предполагать их важную роль в патогенезе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза. А сами факторы, в качестве дополнительных к уже имеющимся, могут использоваться для комплексной оценки функционального состояния лейкоцитов крови в ходе острой фазы заболевания и в период реконвалесценции. Кроме того, данные факторы являются перспективными с точки зрения катамнестических исследований детей групп риска после выписки из клиники для контроля эффективности лечения и уменьшения риска хронизации заболевания.

Список литературы/References

1. Кудин А.П., Романовская Т.Р., Белевцев М.В. Состояние специфического иммунитета при инфекционном мононуклеозе у детей // Медицинский журнал. 2007. Т. 1, № 19. С. 102–106. [Kudin A.P., Romanovskaya T.R., Belevtsev M.V. The state of specific immunity in infectious mononucleosis in children. *Meditsinskiy zhurnal = Medical Journal*, 2007, vol. 1, no. 19, pp. 102–106. (In Russ.)]
2. Кускова Т.К., Белова Е.Г. Семейство герпесвирусов на современном этапе // Лечащий врач. 2004. Т. 5. С. 64–69. [Kuskova T.K., Belova E.G. Herpes viruses family at the present stage. *Lechashchiy vrach = The Attending Physician*, 2004, vol. 5, pp. 64–69. (In Russ.)]
3. Уткин О.В., Новиков В.В. Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК // Российский биотерапевтический журнал. 2007. Т. 6, № 2. С. 13–20. [Utkin O.V., Noviov V.V. Regulation of apoptosis using alternative splicing of mRNA. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2007, vol. 6, no. 2, pp. 13–20. (In Russ.)]
4. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 4. С. 381–390. [Utkin O.V., Noviov V.V. Death receptors in apoptotic modulation. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2012, vol. 132, no. 4, pp. 381–390. (In Russ.)]
5. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Роль некодирующих изоформ мРНК белок-кодирующих генов в регуляции генной экспрессии // Генетика. 2018. Т. 54, № 8. С. 879–887. [Filatova E.N., Utkin O.V. The role of noncoding mRNA isoforms in the regulation of gene expression. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2018, vol. 54, no. 8, pp. 879–887. doi: 10.1134/S0016675818080052 (In Russ.)]
6. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции // Журнал МедиАль. 2014. Т. 2, № 12. С. 172–197. [Filatova E.N., Utkin O.V. Modern approaches to the modeling of herpes infection. *Zhurnal MediAl' = MediAl*, 2014, vol. 2, no. 12, pp. 172–197. (In Russ.)]
7. Anderton E., Yee J., Smith P., Crook T., White R.E., Allday M.J. Two Epstein–Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumor-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene*, 2008, vol. 27, no. 4, pp. 421–433. doi: 10.1038/sj.onc.1210668
8. Barblu L., Smith N., Durand S., Scott-Algara D., Boufassa F., Delfraissy J.F., Cimarelli A., Lamwotte O., Herbeval J.P. Reduction of death receptor 5 expression and apoptosis of CD4+ T cells from HIV controllers. *Clin. Immunol.*, 2014, vol. 155, no. 1, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.clim.2014.07.010
9. Carmilleri-Broet B.S., Davi F., Feuillard J., Bourgeois C., Seilhean D., Hauw J.J., Raphaël M. High expression of latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus and BCL-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas. *Blood*, 1995, vol. 86, no. 2, pp. 432–435

10. Chang M.S., Kim D.H., Roh J.K., Middeldorp J.M., Kim Y.S., Kim S., Han S., Kim C.W., Lee B.L., Kim W.H., Woo J.H. Epstein–Barr virus-encoded BARF1 promotes proliferation of gastric carcinoma cells through regulation of NF- κ B. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 19, pp. 10515–10523. doi: 10.1128/JVI.00955-13
11. Chanut A., Duguet F., Marfak A., David A., Petit B., Parrens M., Durand-Panteix S., Boulon-Deveza M., Gachard N., Youlyouz-Marfak I., Bordessoule D., Feuillard J., Faumont N. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein–Barr virus transformed B cells. *Leukemia*, 2014, vol. 28, no. 4, pp. 871–879. doi: 10.1038/leu.2013.274
12. Choy E.Y., Siu K.L., Kok K.H., Lung R.W., Tsang C.M., To K.F., Kwong D.L., Tsao S.W., Jin D.Y. An Epstein–Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J. Exp. Med.*, 2008, vol. 205, no. 11, pp. 2551–2560. doi: 10.1084/jem.20072581
13. Cohen J.I., Fauci A.S., Varmus H., Nabel G.J., Epstein–Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3: 107fs7. doi: 10.1126/scitranslmed.3002878
14. Collison A., Foster P.S., Mattes J. Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2009, vol. 36, no. 11, pp. 1049–1053. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05258.x
15. Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K.M., Kaye K.M., Kleijnen M.F., Kieff E., Mosialos G. TRAF1, TRAF2 and TRAF3 effect NF- κ B activation by an Epstein–Barr Virus LMP1 domain important for B lymphocyte transformation. *Mol. Cell Biol.*, 1996, vol. 16, pp. 7098–7107. doi: 10.1128/MCB.16.12.7098
16. Devergne O., McFarland E.C., Mosialos G., Izumi K.M., Ware C.F., Kieff E. Role of the TRAF binding site and NF- κ B activation in Epstein–Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, pp. 7900–7908.
17. Dojcinov S.D., Fend F., Quintanilla-Martinez L. EBV-positive lymphoproliferations of B-, T- and NK-cell derivation in non-immunocompromised hosts. *Pathogens*, 2018, vol. 7, p. 28. doi: 10.3390/pathogens7010028
18. Du J., Liang X., Liu Y., Qu Z., Gao L., Han L., Liu S., Cui M., Shi Y., Zhang Z., Yu L., Cao L., Ma C., Zhang L., Chen Y., Sun W. Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Cell Death Differ.*, 2009, vol. 16, no. 2, pp. 219–229. doi: 10.1038/cdd.2008.144
19. Eliopoulos A.G., Stack M., Dawson C.W., Kaye K.M., Hodgkin L., Sinota S., Rowe M., Young L.S. Epstein–Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor associated factors. *Oncogene*, 1997, vol. 14, no. 24, pp. 2899–2916. doi: 10.1038/sj.onc.1201258
20. Eliopoulos A.G., Young L.S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol.*, 2001, vol. 11, pp. 435–444. doi: 10.1006/scbi.2001.0410
21. Floettmann J.E., Rowe M. Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF- κ B activation. *Oncogene*, 1997, vol. 15, pp. 1851–1858. doi: 10.1038/sj.onc.1201359
22. Fu Q., He C., Mao Z.R. Epstein–Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *Journal of Zhejiang University. Science B. Biomedicine and Biotechnology*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 8–24. doi: 10.1631/jzus.B1200189
23. Gires O., Zimmer-Strobl U., Gonnella R., Ueffing M., Marschall G., Zeidler R., Pich D., Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, pp. 6131–6140. doi: 10.1093/emboj/16.20.6131
24. Harold C., Cox D., Riley K.J. Epstein–Barr viral microRNAs target caspase 3. *Virol. J.*, 2016, vol. 13: v145. doi: 10.1186/s12985-016-0602-7
25. Hayward S.D. Viral interactions with the Notch pathway. *Semin. Cancer Biol.*, 2004, vol. 14, no. 5, pp. 387–396. doi: 10.1016/j.semcancer.2004.04.018
26. Hjalgrim H., Askling J., Sørensen P., Madsen M., Rosdahl N., Storm H.H., Hamilton-Dutoit S., Eriksen L.S., Frisch M., Ekbom A., Melbye M. Risk of Hodgkin’s disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92, no. 18, pp. 1522–1528
27. Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6638, pp. 190–195. doi: 10.1038/40657
28. Iyori M., Zhang T., Pantel H., Gagne B.A., Sentman C.L. TRAIL/DR5 plays a critical role in NK cell-mediated negative regulation of dendritic cell cross-priming of T cells. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 6, pp. 3087–3095. doi: 10.4049/jimmunol.1003879
29. Kaye K.M., Devergne O., Harada J.N., Izumi K.M., Yalamanchili R., Kieff E., Mosialos G. Tumour necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein–Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, pp. 11085–11090
30. Knyazev D.I., Starikova V.D., Utkin O.V., Solntsev L.A., Sakharnov N.A., Efimov E.I. Splicing-sensitive DNA-microarrays: peculiarities and application in biomedical research. *CTM*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 162–172. doi: 10.17691/stm2015.7.4.23
31. Kohlhof H., Hampel F., Hoffmann R., Burtscher H., Weidle U.H., Holzel M., Eick D., Zimmer-Strobl U., Strobl L. J. Notch1, Notch 2 and Epstein–Barr virus-encoded nuclear antigen 2 signaling differentially affects proliferation and survival of Epstein–Barr virus-infected B cells. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 22, pp. 5506–5515. doi: 10.1182/blood-2008-11-190090
32. Lantner F., Starlets D., Gore Y., Flaishon L., Yamit-Hezi A., Dikstein R., Leng L., Bucala R., Machluf Y., Oren M., Shachar I. CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival. *Blood*, 2007, vol. 110, no. 13, pp. 4303–4311. doi: 10.1182/blood-2007-04-087486
33. Lee A.W., Champagne N., Wang X., Su X.D., Goodyer C., Leblanc A.C. Alternatively spliced caspase-6B isoform inhibits the activation of caspase-6A. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 42, pp. 31974–31984. doi: 10.1074/jbc.M110.152744
34. Lee Y., Rio D.C. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, 2015, vol. 84, pp. 291–323. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316
35. Luftig M., Yasui T., Soni V., Kang M.S., Jacobson N., Cahir-McFarland E., Seed B., Kieff E. Epstein–Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 1, pp. 141–146. doi: 10.1073/pnas.2237183100
36. McCarthy D. J., Smyth G. K. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 6, pp. 765–771. doi: 10.1093/bioinformatics/btp053

37. Nandakumar A., Uwatoko F., Yamamoto M., Tomita K., Majima H.J., Akiba S., Koriyama C. Radiation-induced Epstein–Barr virus reactivation in gastric cancer cells with latent EBV infection. *Tumor Biol.*, 2017, vol. 39, no. 7: 1010428317717718. doi: 10.1177/1010428317717718
38. Paschos K., Smith P., Anderton E., Middeldorp J.M., White R.E., Allday M.J. Epstein–Barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumor suppressor gene bim. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 6: 1000492. doi: 10.1371/journal.ppat.1000492
39. Portis T., Longnecker R. Epstein–Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/AKT pathway. *Oncogene*, 2004, vol. 23, no. 53, pp. 8619–8628. doi: 10.1038/sj.onc.1207905
40. Pratt Z.L., Zhang J., Sugden B. Simultaneously induce and inhibit oncogene of Epstein–Barr virus can the latent membrane protein 1 (LMP1) apoptosis in B cells. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 8, pp. 4380–4393. doi: 10.1128/JVI.06966-11
41. Schneider F., Neugebauer J., Griese J., Liefold N., Kutz H., Briseño C., Kieser A. The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol.*, 2008, vol. 6, no. 1: 8. doi: 10.1371/journal.pbio.0060008
42. Schröfelbauer B., Polley S., Behar M., Ghosh G., Hoffmann A. NEMO ensures signaling specificity of the pleiotropic IKK β by directing its kinase activity toward I κ B α . *Mol. Cell*, 2012, vol. 47, pp. 111–121. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.020
43. Schwerk C., Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*, 2005, vol. 19, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.026
44. Shinozaki-Ushiku A., Kunita A., Isogai M., Hibiya T., Ushiku T., Takada K., Fukayama M. Profiling of virus-encoded microRNAs in Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma and their roles in gastric carcinogenesis. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5581–5591. doi: 10.1128/JVI.03639-14
45. Snow A.L., Lambert S. L., Natkunam Y., Esquivel C.O., Krams S.M., Martinez O.M. EBV can protect latently infected B cell lymphomas from death receptor-induced apoptosis. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, pp. 3283–3293. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3283
46. Solntsev L.A., Starikova V.D., Sakharnov N.A., Knyazev D.I., Utkin O.V. Strategy of probe selection for studying mRNAs that participate in receptor-mediated apoptosis signaling. *Mol. Biol.*, 2015, vol. 49, no. 3, pp. 457–465. doi: 10.7868/S0026898415030167
47. Steelman L.S., Pohnert S.C., Shelton J.G., Franklin R.A., Bertrand F.E., McCubrey J.A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, 2004, vol. 18, no. 2, pp. 189–218. doi: 10.1038/sj.leu.2403241
48. Tepper C.G., Seldin M.F. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein–Barr virus tumorigenesis in Burkitt’s lymphoma. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 5, pp. 1727–1737.
49. Williams E.J., Embleton N.D., Clark J.E., Bythell M., Ward Platt M.P., Berrington J.E. Viral infections: contributions to late fetal death, stillbirth, and infant death. *J. Pediatr.*, 2013, vol. 163, no. 2, pp. 424–428. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.02.004
50. Wu Z., Aryee M.J. Subset quantile normalization using negative control features. *J. Comput. Biol.*, 2010, vol. 17, no. 10, pp. 1385–1395. doi: 10.1089/cmb.2010.0049
51. Yachie A. Cytologic analysis of Epstein–Barr virus-associated T/Natural killer-cell lymphoproliferative diseases. *Front. Pediatr.*, 2018, vol. 6: 327. doi: 10.3389/fped.2018.00327
52. Zhu D.M., Shi J., Liu S., Liu Y., Zheng D. HIV infection enhances TRAIL-induced cell death in macrophage by down-regulating decoy receptor expression and generation of reactive oxygen species. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 4: e18291. doi: 10.1371/journal.pone.0018291
53. Zimmer-Strobl U., Strobl L.J. EBNA2 and Notch signaling in Epstein–Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.*, 2001, vol. 11, no. 6, pp. 423–434. doi: 10.1006/scbi.2001.0409
54. Zuo J., Thomas W.A., Haigh T.A., Fitzsimmons L., Long H.M., Hislop A.D., Taylor G.S., Rowe M. Epstein–Barr virus evades CD4+ T cell responses in lytic cycle through BZLF1-mediated down-regulation of CD74 and the cooperation of vBcl-2. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 12: 1002455. doi: 10.1371/journal.ppat.1002455

Авторы:

Сахарнов Н.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Князев Д.И., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Sakharnov N.A., Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Knyazev D.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Presnyakova N.B., Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.12.2018
Отправлена на доработку 21.05.2019
Принята к печати 09.09.2019

Received 25.12.2018
Revision received 21.05.2019
Accepted 09.09.2019

ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА И ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ У МОЛОДЫХ МУЖЧИН ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ, АССОЦИИРОВАННОМ С *HELICOBACTER PYLORI*

Л.Б. Дрыгина, Н.А. Дорофейчик-Дрыгина

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

Резюме. В работе представлены современные данные по распространенности хронического гастрита среди лиц молодого возраста. Обсуждается вопрос об участии инфекции *Helicobacter pylori* в формировании низкой плотности костной ткани. Показана актуальность изучения особенностей метаболизма костной ткани при хроническом гастрите, ассоциированном с инфекцией, для оптимизации алгоритма диагностического процесса. Обследованы 200 человек — сотрудников МЧС России — с кислотозависимыми заболеваниями и факторами риска снижения минеральной плотности костной ткани. В зависимости от показателей минеральной плотности костной ткани проведено исследование функциональной активности слизистой оболочки желудка, выявление инфекции *H. pylori*, исследование показателей минерального обмена, уровня витамина D, паратгормона, маркеров ремоделирования костной ткани. Показана ведущая роль атрофических изменений в слизистой оболочке желудка в формировании низкой минеральной плотности костной ткани.

Ключевые слова: инфекция *H. pylori*, низкая минеральная плотность костной ткани, атрофический гастрит, остеокальцин, дезоксиридинолин, минеральный обмен.

PARAMETERS OF MINERAL METABOLISM AND BONE DENSITY IN YOUNG MALES WITH *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED CHRONIC GASTRITIS

Drygina L.B., Dorofeytchik-Drygina N.A.

The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine of the Ministry of Russian Federation for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Here we present the current data on the chronic gastritis prevalence in young people. An issue regarding involvement of *Helicobacter pylori* infection in formation of low bone density is discussed. Examining the features of bone tissue metabolism in infection-associated chronic gastritis to optimize diagnostic algorithm was shown to be of high significance. In the study there were enrolled 200 employees working at the EMERCOM of Russia, who suffered from the acid-dependent gastric diseases and risk factors for reducing bone mineral density. Depending on the bone mineral density parameters, examining functional activity of the gastric mucosa, verification of the *H. pylori* infection, examining parameters of mineral metabolism, vitamin D level, parathyroid hormone, bone tissue remodeling markers was performed. It was shown that atrophic changes in the gastric mucosa the played a lead role in developing low bone mineral density.

Key words: low bone mineral density, atrophic gastritis, low pylori infection, osteocalcin, deoxyriidinoline, mineral metabolism.

Адрес для переписки:

Дрыгина Лариса Борисовна
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 4/2,
ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова МЧС России.
Тел.: 8 (812) 702-63-45, доб. 2-304 (служебн.).
E-mail: drygina@arccerm.spb.ru

Contacts:

Larisa B. Drygina
194044, Russian Federation, St. Petersburg, Academica
Lebedeva str., 4/2, Nikiforov Russian Center of Emergency
and Radiation Medicine.
Phone: +7 (812) 702-63-45, add. 2-304 (office).
E-mail: drygina@arccerm.spb.ru

Библиографическое описание:

Дрыгина Л.Б., Дорофейчик-Дрыгина Н.А. Показатели минерального обмена и плотности костной ткани у молодых мужчин при хроническом гастрите, ассоциированном с *Helicobacter pylori* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 735–742. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-735-742

Citation:

Drygina L.B., Dorofeytchik-Drygina N.A. Parameters of mineral metabolism and bone density in young males with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 735–742. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-735-742

Введение

Несмотря на значимые успехи в диагностике и лечении, хронический гастрит (ХГ) остается широко распространенной патологией среди лиц молодого возраста. То обстоятельство, что ХГ часто сопровождается изменениями в костной системе, было установлено еще 20 лет назад на основании выявленной взаимосвязи морфофункционального состояния слизистых желудка и кишечника и показателей минеральной плотности костной (МПК) ткани [3, 8]. В более поздних работах, при проведении денситометрии, снижение МПК у пациентов с ХГ было выявлено в 58% случаев в регионе L2–L4 позвоночника и 65% случаев в проксимальном отделе бедра [7]. Сделано предположение, что снижение МПК при ХГ в основном обусловлено снижением всасывания кальция, также установлено влияние уровня витамина D на снижение МПК (трабекулярная и кортикальная кость) [6].

В последние годы появились сообщения о влиянии этиологии ХГ на состояние МПК. При анализе биохимических параметров метаболизма костной ткани у 50% женщин и 43% мужчин с *H. pylori* (Hр)-ассоциированным ХГ В.П. Мудров и соавт. (2010) показали повышение уровня паратгормона (ПТГ) и маркера резорбции β -CrossLaps, связанное с титром антител к Hр [4]. При Hр-ассоциированном ХГ повышенный генетический риск развития остеопороза был выявлен у 63% женщин и 100% мужчин. Авторами показано, что у пациентов, инфицированных Hр и имеющих жалобы на функцию ЖКТ, в высоком проценте случаев обнаруживаются изменения в структуре генов, контролирующих костный обмен. Инфекция *СagA+* штаммов Hр была преимущественно распространена среди мужчин с остеопорозом по сравнению с общей популяцией [9]. Поэтому Hр-инфекцию *СagA+* штаммов было предложено считать фактором риска развития остеопороза у мужчин. В работах [1, 2] высказано предположение, что при Hр-ассоциированном ХГ снижение всасывания кальция происходит из-за элемента никеля, который в значительных количествах образуется в желудке в процессе разрушения бактериальной уреазы и конкурирует с кальцием. Однако имеются и противоположные исследования. Так у детей, Hр-инфекция не сопровождается значительными изменениями в уровнях маркеров костного метаболизма, таких как эстрадиол, ПТГ, щелочная фосфатаза и ее костный изофермент, фрагменты коллагена I типа, остеокальцин, кальций и фосфат [10]. На основании вышеизложенного можно заключить, что в настоящее время до конца не установлена взаимосвязь Hр-ассоциированного ХГ с показателями минерализации костной тка-

ни, а исследование особенностей метаболизма костной ткани при ХГ с целью оптимизации диагностики является актуальным.

Материалы и методы

На базе клиники № 1 ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России проведено углубленное обследование 200 пациентов — мужчин с кислотозависимыми заболеваниями и факторами риска снижения минеральной плотности костной ткани, определенными по результатам анкетирования. Возраст обследованных составлял от 21 до 44 года, средний возраст был $30,0 \pm 10,1$ лет.

Для исследования МПК проводилась двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия (DEXA) на остеоденситометре «Lunar DPX-L» (США). Интерпретация данных осуществлялась в соответствии с Российскими рекомендациями по Остеопорозу (2016) для мужчин моложе 50 лет: значение Z-оценки от $-2,0$ SD и ниже — «низкая МПК для хронологического возраста»; значение Z-оценки выше $-2,0$ SD — «в пределах ожидаемых по возрасту значений» [5]. Минеральная плотность костной ткани исследовалась в следующих регионах скелета: 1) поясничном отделе позвоночника (L2–L4); 2) проксимальном отделе бедра (шейка бедра, верхняя часть шейки бедра, треугольник Варда, большой вертел) и 3) предплечье (ультрадистальный отдел лучевой кости и средняя треть лучевой кости). Исследование проводилось в отделе лучевой диагностики ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России (зав. отделом — к.м.н. И.Д. Никифорова).

В зависимости от изменения МПК все обследованные были разделены на две группы:

- I — исследуемая группа — снижение минеральной плотности кости (СМПК) $-2,0$ SD и ниже ($n = 115$);
- II — группа сравнения — нормальные значения минеральной плотности кости (НМПК) — выше $-2,0$ SD ($n = 85$).

Группа контроля ($n = 17$) была сформирована из пациентов группы НМПК с целью сравнения результатов денситометрического определения МПК. В контрольную группу вошли относительно здоровые мужчины из числа сотрудников МЧС России, проходивших ежегодное диспансерное обследование, но с факторами риска снижения МПК по данным анкетирования.

В исследуемой группе СМПК у 100 пациентов значение МПК по Z-критерию было в пределах $-2,0$ — $-2,4$ SD; у 15 человек — ниже $-2,5$ SD.

В сформированных группах пациентов с СМПК и НМПК выявлялась инфекция Hр (уреазный тест в гастробиоптатах, качествен-

ное и количественное определение Анти-Нр в сыворотке крови) тест-системами «ВІОНІТ» (Финляндия); определяли биохимические маркеры функциональной активности слизистой оболочки желудка (СОЖ) в сыворотке крови — пепсиноген I (ПГ I), пепсиноген II (ПГ II), гастрин-17 (Г-176) тест-системами «ВІОНІТ» (Финляндия); маркеры ремоделирования костной ткани остеокальцин в сыворотке крови и дезоксипиридинолин в моче на анализаторе «Immulite 2000» фирмы «Siemens» (Германия) и оценивали статус витамина D по уровню 25-гидроксивитамин D общего ([25(OH)D₂+25(OH)D₃] в сыворотке крови тест-системой «25-Hydroxy Vitamin D EIA» (IDS, Германия).

Критерии выявления хронического атрофического гастрита (ХАГ) были приняты согласно [11]: атрофические изменения СОЖ при гистологии в теле и антральном отделе желудка и снижение ПГ I в сыворотке крови от 50 мкг/л и ниже. Биохимическими маркерами атрофии тела желудка служат понижение уровня ПГ I ниже 25 мкг/л и повышение базального уровня гастрин-17 более 5 пмоль/л.

Биохимические исследования параметров минерального обмена проводились на анализаторе «Synchron CX 9 PRO» (Beckman Coulter, США) и анализаторе газов крови, оксиметрии и метаболитов «ABL 800 FLEX» (Radiometr, Дания).

Общеклинические и биохимические показатели определяли при поступлении пациента в стационар на обследование после двухдневной диеты с ограничением потребления кальцийсодержащих продуктов.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2007», «Statistica 6.0». Для проверки согласия с нормальным типом распределения использовали критерий Шапиро–Уилка W. Был использован метод описательной статистики с определением

ем медианы показателей (Me) и интерквартильного размаха Q [Q_{0,25} – Q_{0,75}]. Для определения различий в двух группах использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. При сравнении нескольких групп проводился дисперсионный анализ Краскелла–Уоллиса и медианный тест, сравнение средних рангов для всех групп. Критерий Пирсона χ^2 применялся при сравнении частотных величин.

Результаты

Оценка функциональной активности воспаления и атрофии гастродуоденальной слизистой оболочки в группах СМПК и НМПК проведена с помощью определения в сыворотке крови показателей «Biohit GastroPanel» Г-176, ПГ I и ПГ II (табл. 1).

В группах СМПК уровень Г-176 в сыворотке крови был достоверно выше, чем у пациентов НМПК ($p < 0,05$). У них, наблюдалась тенденция к увеличению концентрации ПГ II ($p > 0,05$). Важным выявленным фактом было достоверное снижение ПГ I (Me — 65,0 мкг/л; $p < 0,05$) у пациентов со снижением МПК ниже $-2,5$ SD по Z критерию.

С учетом анализа данных эндоскопии, гистологии и серологических показателей функционального состояния слизистой желудка также установлено, что при СМПК чаще, чем в группе НМПК выявляются атрофические изменения СОЖ — у 31,3% обследованных пациентов (табл. 2). Хронический неатрофический гастрит (ХНГ) выявлялся практически с одинаковой частотой — у 55,6% пациентов со сниженной и в 48,2% случаев — с нормальной МПК.

Среди пациентов групп СМПК и НМПК проведено выявление Нр-инфекции уреазным тестом в биоптатах СОЖ, качественными и количественными методами определения уровня антител IgG к Нр (табл. 3). По данным уреазного теста, бактерия Нр выявлялась у пациентов

Таблица 1. Показатели атрофии, воспаления и функциональной активности СОЖ у молодых мужчин с различной МПК, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Table 1. Parameters of atrophy, inflammation and functional activity of the gastric mucosa in young males with various bone mineral density (BMD), Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Показатель и референтный интервал Parameter and reference range	Г-176, пмоль/л G-17, pmol/l	ПГ I, мкг/л PG I, mkg/l	ПГ II, мкг/л PG II, mkg/l
	2–10	50–120	3–15
Исследуемая подгруппа (1) (n = 100) Group I	14,1 [10,3; 15,7]	127,0 [108; 156]	18,0 [12; 26]
Исследуемая подгруппа (2) (n = 15) Group II	23,3 [14,5; 25,1]	65,0* [48; 76]	17,0 [16; 24]
Группа сравнения (n = 85) Comparison group	1,7* [0,3; 4,6]	133,0 [110; 151]	13,0 [9; 17]

Примечание. *Значимое отличие от остальных групп ($p < 0,05$).

Note. *Significant difference compared to other groups ($p < 0.05$).

Таблица 2. Распространение различных видов гастритов по данным «Biohit GastroPanel», эндоскопического и гистологического исследования, % (абс.)

Table 2. Distribution of various gastritis types according to «Biohit GastroPanel», endoscopic and histological examination, % (abs.)

	Нормальная СОЖ Normal gastric mucosa	ХАГ Chronic atrophic gastritis	ХНГ Chronic gastritis
Исследуемая группа (n = 115) Study group	13,0 (15)*	31,3 (36)	55,6 (64)
Группа сравнения (n = 85) Comparison group	49,4 (42)	2,4 (2)*	48,2 (41)

Примечание. *Значимое отличие ($p < 0,05$; парное сравнение групп — критерий Пирсона χ^2).Note. *Significant difference compared to other groups ($p < 0.05$; paired group comparison, Pearson's test χ^2).**Таблица 3. Показатели инфицированности Нр пациентов с низкой МПК и в норме, Ме [Q_{0,25}–Q_{0,75}]**Table 3. HP infection rates in patients with low and normal BMD, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

	Уреазный тест Urease test	Серологический тест Анти-Нр Serological anti-HP test	
	Положительный, % (абс.) Positive signal, % (abs.)	Положительный, % (абс.) Positive signal, % (abs.)	ед. units
Исследуемая подгруппа (1) (n = 100) Subgroup (1)	45 (45)*	100 (100)*	115 [74; 120]*
Исследуемая подгруппа (2) (n = 15) Subgroup (2)	46,7 (7)*	100 (15)*	131 [84; 140]*
Группа сравнения (n = 85) Comparison group	64,7 (55)	76,5 (65)	75 [56; 98]

Примечание. *Значимое отличие от группы сравнения ($p < 0,05$).Note. *Significant difference with comparison group ($p < 0.05$).**Таблица 4. Частота выявления Нр-ассоциированных гастритов у обследованных пациентов с различной МПК по данным «Biohit GastroPanel», % (абс.)**

Table 4. Frequency of detected HP-associated gastritis in patients with various BMD based on «Biohit GastroPanel» data, % (abs.)

Заболевание Disease	Нормальная МПК Normal BMD	Сниженная МПК Low BMD
Хронический неатрофический гастрит (n = 105) Chronic gastritis	41	64
в т.ч. хронический неатрофический гастрит Нр-ассоциированный including chronic HP-associated non-atrophic gastritis	80,4 (33)	100 (64)
Хронический атрофический гастрит (n = 38) Chronic atrophic gastritis	2	36
в т.ч. хронический атрофический гастрит Нр-ассоциированный including chronic HP-associated atrophic gastritis	100 (2)	100 (36)

Таблица 5. Значение Z-критерия МПК при различных кислотозависимых заболеваниях, Ме [Q_{0,25}–Q_{0,75}]Table 5. BMD Z-score in various acid-dependent diseases, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Параметр Parameter	Контрольная группа (n = 17) Control group	ХНГ (n = 105) Chronic gastritis	ХАГ (n = 38) Chronic atrophic gastritis
Z-критерий L2–L4 L2–L4 Z-score	1,1 [0,2; 1,6]	–1,5 [0,7; 2,0]	–2,8 [1,6; 3,2]**
Z-критерий проксимальный отдел бедра Proximal femur Z-score	1,0 [0,1; 1,5]	–1,8 [1,1; 2,9]	–2,5 [1,2; 3,8]*
Z-критерий предплечье Forearm Z-score	1,5 [0,7; 2,0]	–1,9 [0,6; 2,4]	–3,1 [1,7; 4,2]**

Примечание. *Различия с контрольной группой достоверны ($p < 0,05$); **различия с остальными группами достоверны ($p < 0,05$).Note. *Significant differences with the control group ($p < 0.05$); **significant differences with other groups ($p < 0.05$).

с СМПК реже по сравнению с группой сравнения НМПК (64,7%, $p < 0,05$). По результатам качественного серологического теста доля пациентов с наличием положительных результатов выявления антител IgG к *H. pylori* была наибольшей в группе СМПК — 100% ($p < 0,05$), что подтверждалось более высокими средними показателями количественного определения уровней IgG к *H. pylori* у пациентов групп СМПК (Me — 115 и 131 ед.) по сравнению с пациентами группы сравнения НМПК (Me — 75 ед.) соответственно.

Частота выявления Нр-ассоциированных гастритов на основании данных «Biohit Gastro-Panel» у обследованных пациентов групп СМПК и НМПК представлена в таблице 4.

Развитие атрофических изменений СОЖ тела и антрального отдела желудка произошло на фоне инфекции Нр, что подтверждалось выявлением антител к бактерии (более 40 ед. по результатам серологического исследования «Biohit GastroPanel»).

Результаты определения МПК по Z-критерию у обследованных при хроническом атрофическом, неатрофическом гастрите и в контрольной группе представлены в таблице 5.

Анализ изменения Z-критерия МПК в обследованных группах показал, что наиболее выраженное снижение МПК наблюдалось у пациентов с ХАГ (табл. 5).

Результаты определения показателей минерального обмена, паратгормона, статуса витамина D по концентрации сывороточного 25(ОН)-витамина D (кальцидиола) в исследуемой группе и группе сравнения представлены в таблице 6.

Обращает на себя внимание тот факт, что у мужчин молодого возраста при снижении МПК наблюдается статистически значимое повышение концентрации ПТГ ($p < 0,05$) и снижение уровня ионизированного кальция ($p < 0,05$) по отношению к группе НМПК, а уровень кальцидиола близок к нижней границе референтной нормы для данного показателя.

В группе СМПК достоверно повышается уровень маркера резорбции Друг/Сг и маркера костного формирования — остеокальцина. Однако скорость обменных процессов в группах СМПК и НМПК одинакова, что подтверждается индексом ОК/Друг в группах: 2,55 и 2,14 соответственно.

Среди пациентов с атрофическим гастритом мы выделили пациентов с ХАГ тела желудка. Анализ данных, представленных в таблице 7, показал, что при выраженном атрофическом процессе в слизистой оболочке тела желудка (ПГ I < 25 мкг/л) наблюдается достоверное понижение концентрации ионизированного кальция.

При атрофических изменениях СОЖ концентрация ионизированного кальция достоверно снижалась до значений 1,19 [1,17; 1,22].

В исследовании проводилась оценка влияния воспаления СОЖ на показатели минерального обмена (табл. 8).

При активном воспалительном процессе в СОЖ, обусловленном инфекцией Нр, когда уровень ПГ II значительно повышается (ПГ II > 15 мкг/л), выявлено достоверное повышение уровня ПТГ, и тенденция к повышению концентрации магния (табл. 8). Лабораторно подтвержденного изменения концентрации кальция в периферической крови выявить не удалось.

Таблица 6. Показатели минерального обмена, ПТГ и кальцидиола у молодых мужчин со сниженной и нормальной МПК, Me [$Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$]

Table 6. Parameters of mineral metabolism, PTH and calcidiol level in young males with lowered and normal BMD, Me [$Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$]

Показатель, ед. изм. Parameter, U	Сниженная МПК (n = 115) Low BMD	Нормальная МПК (n = 85) Normal BMD
Са ионизированный, ммоль/л Ca ion., mmol/l	1,19 [1,17; 1,21]*	1,22 [1,21; 1,24]
Са общий, ммоль/л Ca total, mmol/l	2,42 [2,35; 2,53]	2,43 [2,30; 2,50]
Mg общий, ммоль/л Mg total, pmol/l	0,90 [0,83; 1,00]	0,85 [0,80; 0,89]
ПТГ, пмоль/л РТН, pmol/l	4,0 [3,3; 5,5]*	3,5 [2,8; 4,9]
Кальцидиол, нмоль/л Calcidiol, nmol/l	54,1 [44,6; 79,0]	62,9 [46,1; 70,2]
Друг/Сг, нмоль/мкмоль	4,0 [2,3; 5,5]*	2,8 [0,6; 3,8]
Остеокальцин (ОК), нг/мл Osteocalcin (OC), ng/ml	10,2 [7,2; 17,5]*	6,0 [3,6; 8,5]

Примечание. *Значение p для U-теста Манна–Уитни, различия с группой сравнения достоверны ($p < 0,05$).

Note. *p value calculated by using Mann–Whitney U-test, significant differences with comparison group are shown ($p < 0.05$).

Обсуждение

Нами было проведено выявление Нр-инфекции у пациентов с хроническим атрофическим и неатрофическим гастритом при использовании уреазного теста в гастробиоптатах и серологического метода определения антител класса G к Нр в сыворотке крови. Установлено преимущественное по сравнению с уреазным тестом выявление бактерии Нр серологическим методом (качественный и количественный анализ определения антител IgG к Нр) в сыворотке крови у пациентов группы СМПК, что, вероятно, обусловлено имеющимися у них атрофическими изменениями СОЖ, когда плотность обсеменения Нр низка и, вследствие этого, уменьшена суммарная уреазная активность бактерий. При снижении МПК Нр-инфекция была выявлена в 100% случаев при ХАГ и ХНГ. Достоверное повышение Г-17 более 10 пмоль/л и более низкие показатели ПГ I ниже 65 мкг/л в группе СМПК свидетельствуют о наличии у обследованных пациентов атрофических изменений СОЖ на фоне воспалительной реакции эпителия желудка, обусловленной инфи-

цированием Нр. Была установлена прямая корреляционная зависимость ПГ II от уровня антител к Нр ($r = 0,35$; $p < 0,05$).

Выявлена умеренная достоверная связь ПГ I, Г-176 и значений МПК по Z-критерию. Показатели минеральной плотности костной ткани по Z-критерию были ниже у обследованных с низкими значениями ПГ I и с более высокими значениями Г-176 в крови. При снижении МПК более $-2,5$ SD медиана концентрации ПГ I в сыворотке крови была самой низкой и составила 65,0 мкг/л, а при нормальной МПК — 133,0 мкг/л ($r = 0,391$; $p = 0,035$). При нормальной МПК концентрация Г-176 равна 1,7 [0,3; 4,6] пмоль/л, а в группе пациентов со сниженной МПК ($n = 115$) — 18,7 [11,5; 23,1] пмоль/л ($r = 0,293$; $p = 0,043$). Наличие инфекции Нр можно считать важным фактором развития атрофии СОЖ и, в конечном итоге, снижения МПК у лиц с факторами риска развития остеопении даже в молодом возрасте. Так, изменение МПК во всех отделах скелета у молодых мужчин с ХАГ было $-2,8$ [1,4; 3,9] SD, с ХП — $-2,06$ [0,5; 2,7] SD. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что снижение МПК у молодых

Таблица 7. Изменение параметров кальцийрегулирующей системы в зависимости от уровня пепсиногена I, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Table 7. Changes in parameters of calcium regulating system depending on serum pepsinogen I level, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Показатель, ед. изм. Parameter, U	ПГ I > 25 мкг/л PG I > 25 mkg/l	ПГ I < 25 мкг/л PG I < 25 mkg/l	p
Са ионизированный, ммоль/л Ca ion., mmol/l	1,21 [1,18; 1,23]	1,19 [1,17; 1,22]*	0,0276
Са общий, ммоль/л Ca total, mmol/l	2,43 [2,37; 2,53]	2,23 [2,34; 2,51]	0,8262
Мг общий, ммоль/л Mg total, pmol/l	0,90 [0,81; 1,00]	0,96 [0,84; 1,04]	0,2931
ПТГ, пмоль/л PTH, pmol/l	4,4 [3,7; 5,9]	4,9 [3,9; 6,0]	0,0533

Примечание. *Значение p для U-теста Манна–Уитни, различия между группами достоверны ($p < 0,05$).

Note. *p value calculated in Mann–Whitney U-test, significant differences with comparison group are shown ($p < 0,05$).

Таблица 8. Изменение параметров кальцийрегулирующей системы в зависимости от уровня пепсиногена II, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Table 8. Changes in parameters of calcium-regulating system depending on serum pepsinogen II level, Me [Q_{0,25}–Q_{0,75}]

Показатель, ед. изм. Parameter, U	ПГ II > 15 мкг/л PG II > 15 mkg/l	ПГ II < 15 мкг/л PG II < 15 mkg/l	p
Са ионизированный, ммоль/л Ca ion., mmol/l	1,22 [1,15; 1,25]	1,22 [1,12; 1,24]	0,5775
Са общий, ммоль/л Ca total, mmol/l	2,43 [2,37; 2,53]	2,43 [2,34; 2,51]	0,8262
Мг общий, ммоль/л Mg total, pmol/l	0,90 [0,81; 1,00]	0,86 [0,81; 0,94]	0,2911
ПТГ, пмоль/л PTH, pmol/l	4,4 [3,7; 5,9]	3,6 [2,9; 5,0]	0,0033*

Примечание. *Значение p для U-теста Манна–Уитни, различия между группами достоверны ($p < 0,05$).

Note. *p value calculated in Mann–Whitney U-test, significant differences with comparison group are shown ($p < 0,05$).

мужчин при кислотозависимых заболеваниях органов пищеварения наиболее выражены при ХАГ, в большей степени ассоциированы с атрофическими изменениями СОЖ. При ХАГ снижение происходит в нескольких регионах скелета, преимущественно предплечье, L2–L4, проксимальном отделе бедра.

Известно, что ПТГ является наиболее важным регулятором кальциевого метаболизма. Нами показано, что у пациентов группы СМПК более низким значениям ионизированного кальция 1,19 [1,17; 1,21] ммоль/л соответствует более высокий уровень ПТГ 4,0 [3,3; 5,5] пмоль/л и магния 0,90 [0,83; 1,00] моль/л. Полученные данные подтверждают тот факт, что регуляция уровня кальция и паратгормона осуществляется по механизму обратной связи. Важно отметить, что у обследованных нами пациентов молодого возраста с кислотозависимыми заболеваниями выявлено компенсаторное повышение уровня магния, направленное на поддержание минерального гомеостаза. Медиана значений магния общего у пациентов с НМПК — 0,85 ммоль/л, при снижении МПК — 0,90 ($p > 0,05$). Проведенный анализ уровня 25(ОН)-витамина D в сыворотке крови в зависимости от изменения МПК показал отсутствие значимых различий у обследованных групп пациентов, у молодых мужчин с НМПК и СМПК уровень кальцидиола был близок к границе допустимой нормы 50 нмоль/л. Получена умеренная корреляционная зависимость кальцидиола от уровня общего кальция сыворотки крови ($r = 0,326$; $p < 0,05$) и слабая взаимосвязь концентрации 25(ОН)-витамина D от уровня общего магния ($r = -0,176$; $p < 0,05$) в сыворотке крови. Вероятно, отсутствие значимой зависимости от содержания ионизированного кальция объясняется тем фактом, что в данном исследовании определяется уровень не гормонально активной формы витамина D, а 25(ОН)-витамина D, определяющего запас витамина в организме. Концентрация магния в крови обследованных пациентов была смеще-

на к нижней границе референтного интервала. Этим можно объяснить тот факт, что снижение 25(ОН)-витамина D у части обследованных не приводит к повышению уровня ПТГ.

При комплексном исследовании метаболических процессов на основании оценки уровней маркеров костной резорбции и костного формирования у молодых мужчин с кислотозависимыми заболеваниями в большинстве случаев выявляются: высокий уровень маркера резорбции Друп/Сг и маркера образования новой кости ОК. Однако сравнение индексов ОК/Друп в группе СМПК и НМПК показало, что скорость ремоделирования у пациентов практически одинакова (2,55 и 2,14 соответственно). Это указывает на то, что процессы восстановления костной массы достаточно активны.

Наши исследований показали, что уровень ионизированного кальция в крови у пациентов с активной воспалительной реакцией СОЖ (ПГ II > 15 мкг/л), обусловленной инфекцией Нр, не отличается от значений этого показателя при отсутствии воспаления. Достоверное снижение концентрации ионизированного кальция выявлено в подгруппе пациентов с атрофическими изменениями в области тела желудка, когда уровень ПГ I становится ниже 25 мкг/л.

Заключение

Таким образом, можно сделать заключение, что у пациентов с кислотозависимыми заболеваниями и низким уровнем минеральной плотности костной ткани уровень антител к Нр был достоверно выше, чем при нормальной МПК, бактерия Нр выявлялась в 100% случаев. При этом доля атрофических изменений СОЖ в этой группе пациентов была так же высока, частота выявления хронического атрофического гастрита составила 31,3%. Именно с атрофическими изменениями в СОЖ связано изменение показателей минерального обмена: понижение уровня ионизированного кальция, повышение ПТГ, Друп/Сг и остеокальцина.

Список литературы/References

1. Захарова И.Н., Творогова Т.М., Воробьева А.С. Остеопения у подростков: фокус на элементный гомеостаз // Российский медицинский журнал. 2009. Т. 17, № 1. С. 45–47. [Zakharova I.N., Tvorogova T.M., Vorobyova A.S. Osteopenia in adolescents: focus on elemental homeostasis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2009, vol. 17, no. 1, pp. 45–47. (In Russ.)]
2. Иванов А.В., Китаева Л.В., Милейко Е.В., Шишлов В.А., Иванова И.И., Григорян Т.М. Генетические нарушения в соматических клетках и роль никеля в патогенезе хеликобактериоза. Областная клиническая больница. Клинико-диагностические и организационные проблемы: сборник. СПб.: СПбГПМА, 2003. Т. 3. С. 174–179. [Ivanov A.V., Kitaeva L.V., Milejko E.V., Shishlov V.A., Ivanova I.I., Grigorjan T.M. Genetic disorders in somatic cells and the role of nickel in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. In: Regional clinical hospital. Clinical, diagnostic and organizational problems. St. Petersburg: St. Petersburg Pediatric Medical Academy, 2003, vol. 3. pp. 174–179. (In Russ.)]
3. Котова С.М., Горделадзе А.С., Карлова Н.А. Морфофункциональные особенности двенадцатиперстной кишки при остеопеническом синдроме у детей и подростков // Терапевтический архив. 1999. № 2. С. 40–44. [Kotova S.M., Gordeladze A.S., Karlova N.A. Morphofunctional features of the duodenum in osteopenic syndrome in children and adolescents. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 1999, no. 2, pp. 40–44. (In Russ.)]

4. Мудров В.П., Нелюбин В.Н., Stamm М.В., Власенко И.В., Донников А.Е. Генетическая и биохимическая диагностика остеопороза // Лаборатория. 2010. № 2. С. 12. [Mudrov V.P., Nelyubin, V.N., Stamm, M.V., Vlasenko I.V., Donnikov A.E. Genetic and biochemical diagnosis of osteoporosis. *Laboratoriya = Laboratory*, 2010, no. 2, p. 12. (In Russ.)]
5. Остеопороз. Клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 272 с. [Osteoporosis. Clinical guidelines. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2016, 272 p. (In Russ.)]
6. Слохова Н.К. Коррекция минеральной плотности костной ткани у больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта // Кубанский научно-медицинский вестник. 2014. Т. 146, № 4. С. 106–109. [Slochova N.K. Correction of mineral bone density in patients with diseases of the gastrointestinal tract. *Kubanskiy nauchno-meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2014, vol. 146, no. 4, pp. 106–109. (In Russ.)]
7. Слохова Н.К., Тотров И.Н. Изменения костной ткани при хронических заболеваниях желудка и тонкой кишки // Вестник молодого ученого. 2014. № 3–4. С. 13–15. [Slochova N.K., Totrov I.N. Changes of bone in chronic diseases of the stomach and small intestine. *Vestnik molodogo uchenogo = Bulletin of Young Scientist*, 2014, no. 3–4, pp. 13–15. (In Russ.)]
8. Carbtree J.E. Gastric mucosal inflammatory response to *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1995, vol. 10, pp. 29–37.
9. Figura N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in male patients with osteoporosis and controls. *Dig. Dis. Sci.*, 2005, vol. 50, no. 5, pp. 847–852.
10. Nielsen H. *Helicobacter pylori* seropositivity is increased in osteoporosis. *Gut*, 2001, vol. 47, suppl. 1, pp. 89–90.
11. Sipponen P., Harkonen M., Alanko A. Diagnosis of atrophic gastritis from serum samples. *Clin. Lab.*, 2002, vol. 48, pp. 505–515.

Авторы:

Дрыгина Л.Б., д.б.н., профессор, зав. клинико-диагностической лабораторией, ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;
Дорофейчик-Дрыгина Н.А., врач стоматолог-ортодонт поликлинического отделения ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Drygina L.B., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory; Leading Researcher, Laboratory Diagnostics Department, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;
Dorofeytchik-Drygina N.A., Orthodontist, Outpatient Department, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.11.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 11.04.2019

Received 09.11.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 11.04.2019

СКРИНИНГ МАРКЕРОВ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

А.О. Негоденко¹, Д.Н. Лучинин¹, П.Ш. Коновалов², О.А. Павлюкова²,
Е.А. Скрынникова², Д.Р. Прилепская¹, Е.В. Молчанова¹, И.А. Баркова¹,
Д.В. Викторов¹, А.В. Топорков¹

¹ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

² ГБУЗ Волгоградский областной центр крови, г. Волгоград, Россия

Резюме. Волгоградская область считается эндемичной по заболеваемости лихорадкой Западного Нила (ЛЗН). Циркуляция вируса Западного Нила (ВЗН) установлена для данного региона. Ранее при отдельных исследованиях в материале, собранном на территории Волгоградской области, были выявлены маркеры вирусов Калифорнийской серогруппы (КСГ), Синдбис и Укуниими. Клинические проявления ЛЗН, лихорадок КСГ, Синдбис и Укуниими разнообразны, но в большинстве случаев заболевания протекают бессимптомно, в связи с чем, помимо трансмиссивного пути передачи, появляется опасность передачи вируса при трансфузиологических манипуляциях. Цель работы заключалась в обнаружении антител к вирусам Западного Нила, клещевого энцефалита, Калифорнийской серогруппы (Тягиня, Инко), Сидбис, Укуниими среди доноров Волгоградской области. Методами ИФА были исследованы 404 образца сывороток крови доноров, проживающих в г. Волгограде и районах Волгоградской области. В результате проведенных скрининговых исследований доля проб сывороток крови доноров Волгоградской области с наличием антител к возбудителям арбовирусных инфекций составила 18,32%. В 67 пробах из 404 (16,58%) были обнаружены антитела к возбудителю лихорадки Западного Нила, в трех пробах из 279 (1,08%) — к вирусу клещевого энцефалита, в одной пробе из 92 (1,09%) — к вирусам лихорадок Калифорнийской серогруппы и Укуниими, в двух пробах из 92 (2,17%) — к вирусу лихорадки Синдбис. Наибольшее количество положительных проб с наличием IgG и IgM к вирусу Западного Нила было выявлено среди жителей г. Волгограда (29 из 110, 26%) и Октябрьского района (7 из 25, 28%). Специфические иммуноглобулины к вирусам Синдбис, Укуниими и КСГ были обнаружены в образцах сывороток крови доноров, проживающих в Калачевском районе и г. Волгограде. Анализ распределения доноров в зависимости от возраста и определение доли серопозитивных людей в каждой возрастной группе показал следующие результаты: наименьший процент проб (14,5%) с наличием антител к ВЗН, Синдбис, Укуниими и КСГ принадлежал донорам 32–41-летнего возраста, наибольший процент (25%) — донорам возрастной категории 52–61 лет. Наличие специфических антител у здорового населения области (доноров) свидетельствует о возможно бессимптомно перенесенных заболеваниях. В связи с этим требуются дальнейшие

Адрес для переписки:

Негоденко Анастасия Олеговна
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
Волгоградский научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8442) 37-37-74, 37-33-65. Тел./факс: 8 (8442) 39-33-36.
E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Contacts:

Anastasia O. Negodenko
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (8442) 37-37-74, 37-33-65. Phone/Fax: +7 (8442) 39-33-36.
E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Библиографическое описание:

Негоденко А.О., Лучинин Д.Н., Коновалов П.Ш., Павлюкова О.А.,
Скрынникова Е.А., Прилепская Д.Р., Молчанова Е.В., Баркова И.А.,
Викторов Д.В., Топорков А.В. Скрининг маркеров арбовирусных
инфекций в образцах сывороток крови здоровых доноров
на территории Волгоградской области // Инфекция и иммунитет. 2019.
Т. 9, № 5–6. С. 743–749. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-743-749

Citation:

Negodenkova A.O., Luchinin D.N., Kononov P.Sh., Pavlyukova O.A.,
Skrynnikova E.A., Prilepskaya D.R., Molchanova E.V., Barkova I.A.,
Viktorov D.V., Toporkov A.V. A screening for serum markers of arbovirus
infections in healthy blood donors from the Volgograd Region // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 5–6, pp. 743–749. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-743-749

исследования для установления роли перечисленных арбовирусов в региональной инфекционной патологии. Полученные результаты говорят о необходимости проведения в дальнейшем постоянного серологического мониторинга за возбудителями арбовирусных инфекций на территории Волгоградской области.

Ключевые слова: арбовирусы, лихорадка Западного Нила, лихорадка Синдбис, лихорадка Укуниеми, лихорадка Калифорнийской серогруппы, ИФА, серологический мониторинг.

A SCREENING FOR SERUM MARKERS OF ARBOVIRUS INFECTIONS IN HEALTHY BLOOD DONORS FROM THE VOLGOGRAD REGION

Negodenko A.O.^a, Luchinin D.N.^a, Kononov P.Sh.^b, Pavlyukova O.A.^b, Skrynnikova E.A.^b, Prilepskaya D.R.^a, Molchanova E.V.^a, Barkova I.A.^a, Viktorov D.V.^a, Toporkov A.V.^a

^a Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation

^b Volgograd Regional Blood Center, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Volgograd region is considered to be endemic West Nile fever (WNV) area due to the established circulation of the West Nile virus (WNV) therein. Some previous independent studies examining samples collected on the territory of the Volgograd region revealed markers related to the California serogroup (CSG), Sindbis and Ukuniemi viruses. WNV, CSG, Sindbis and Ukuniemi fever mainly being asymptomatic posing thereby a threat of virus spread due to transfusiological manipulations along with vector-borne transmission are manifested by diverse clinical signs. The study was aimed at detection of antibodies specific to West Nile, tick-borne encephalitis, California serogroup (Tyaginya, Inko), Sidbis, and Ukuniemi viruses in blood donors from the Volgograd region. For this, 404 blood sera samples collected from blood donors residing in the Volgograd as well as the Volgograd region were examined by ELISA. It was found that percentage of blood serum samples positive for arbovirus-specific antibodies was 18.32%. Among the, 67 out of 404 (16.58%) samples contained anti-WNV antibodies, 3 out of 279 (1.08%) samples — to tick-borne encephalitis virus, 1 out of 92 (1.09%) — to California serogroup fever and Ukuniemi viruses, and 2 out of 92 (2.17%) — to Sindbis fever virus. Importantly, the peak number of IgG and IgM WNV-positive samples was found among residents of Volgograd (29 out of 110, 26%) and Otktyabrsky district (7 out of 25, 28%). In addition, anti-Sindbis, Ukuniemi and CSG virus antibodies were detected in blood serum samples from blood donors residing in the Kalachevsky region and the city of Volgograd. Analyzing age-related distribution and percentage of seropositive subjects in each age group showed as follows: the lowest percentage (14.5%) was positive for anti-WNV, Sindbis, Ukuniemi and CSG virus antibodies in blood donors aged 32–41 years, whereas the peak percentage (25%) — in the subjects aged 52–61 years. Thus, virus specific antibodies detected in healthy individuals in the aforementioned region evidence about potential recovery after asymptomatic infections. In this regard, further research is required to determine a role of the such arboviruses in the structure of regional infectious diseases. The data obtained suggest a need to continue serological arbovirus monitoring in the Volgograd region.

Key words: arboviruses, WNV, Sindbis, ukuniemi fever, California Serogroup, ELISA, serological monitoring.

Введение

Арбовирусы — это экологическая группа вирусов, передающихся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущих членистоногих: комаров, клещей, москитов, мошек и мокрецов. Арбовирусы не являются единой таксономической группой и включают представителей различных семейств: *Togaviridae* (более 30 видов), *Flaviviridae* (53 вида), *Bunyaviridae* (порядка 200 видов), *Reoviridae* (60 видов), *Rhabdoviridae* (50 видов). У многих из них выявлена способность вызывать заболевания у людей и животных. Такие арбовирусные инфекции, как лихорадка денге, Западного Нила (ЛЗН), Зика, чикунгуния, долины Рифт, карельская и желтая лихорадка, энцефалиты — японский, клещевой, Сент-Луис — далеко не весь список опасных для человека и животных болезней, имеющих большое значение для здравоохранения и ветеринарии во всем мире [4, 16].

В начале 80-х гг. при скрининговом исследовании крови населения некоторых районов Волгоградской области были обнаружены антитела к вирусу лихорадки Западного Нила (ВЗН), а в комарах, отловленных в пойме р. Волга, выявлен антиген вируса. ЛЗН в этом регионе впервые была зарегистрирована в 1999 г. Число лабораторно подтвержденных случаев составило около 400 человек при летальности порядка 10%. В то же время истинное число больных было в 3–10 раз больше, а число инфицированных превышало 200 000 человек, что подтверждено результатами серологического обследования населения до и после вспышки [8]. Также ранее в материале, собранном на территории Волгоградской области, определялись маркеры вирусов Калифорнийской серогруппы (КСГ), Синдбис и Укуниеми [5, 6]. Однако постоянного мониторинга, направленного на выявление антигенов перечисленных возбудителей в полевом материале и на обнаружение антител к дан-

ным инфекциям в крови людей и животных, не проводилось.

Цель работы заключалась в обнаружении антител к вирусам ЛЗН, КСГ, Сидбис, Укуниеми среди доноров Волгоградской области.

Материалы и методы

В работе были использованы 404 сыворотки крови доноров, проживающих на территории Волгоградской области. Материал был предоставлен ГБУЗ Волгоградский областной центр крови. Перед забором материала доноры проходили медицинский осмотр, где подтверждалось отсутствие признаков инфекционного заболевания. Полученные сыворотки инактивировали добавлением мертиолята натрия в конечной концентрации 0,01% с дальнейшим прогреванием при 56°C в течение 30 мин. Специфические антитела к возбудителям арбовирусных инфекций определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) тест-системами «БиоСкрин-Синдбис» комплект «G», «БиоСкрин-Укуниеми» комплект «G», «БиоСкрин-КСГ» комплект «G» (ЗАО «Биосервис», Россия), а также Anti-TBE (IgM), Anti-West Nile Virus (IgM, IgG), Avidity: Anti-West Nile Virus (IgG) (Euroimmun, Германия). Результаты реакции учитывали на фотометре Infinite F50 (TECAN, Австрия).

Результаты и обсуждение

Методами ИФА были исследованы образцы сывороток крови доноров, проживающих в 11 административных районах Волгоградской

области. Результаты представлены в таблице 1. Из 404 сывороток в 35 (8,66%) и 32 (7,92%) пробах были выявлены иммуноглобулины к ВЗН классов G (IgG) и M (IgM) соответственно. При этом в пробах с наличием IgM не были обнаружены IgG, что является показателем первичной инфекции и предполагает течение заболевания в бессимптомной форме.

Серологическая диагностика, основанная на определении титра специфических иммуноглобулинов класса G, может быть полезной при дифференциации активного периода болезни от перенесенной в прошлом и уже неактивной инфекции. Как правило, IgG в сыворотке крови обнаруживаются уже со второй недели инфицирования и сохраняются длительное время. Давность перенесенного заболевания помогает установить определение уровня avidности иммуноглобулинов. В нашем исследовании в случае выявления IgG к ВЗН в половине проб индекс относительной avidности (RAI) равнялся более 60%, в половине показатель RAI находился в диапазоне 40–60%. Выявление в испытуемой сыворотке антител с индексом avidности равным или превышающим 60% свидетельствует о наличии высокоавидных антител — маркеров перенесенной в прошлом или персистирующей инфекции. Показатель avidности антител в интервале 40–60% говорит о поздней стадии первичной инфекции или недавно перенесенном заболевании.

По результатам изучения уровня иммунной прослойки людей, находящихся на определенной территории можно сделать достоверное заключение о степени активности природных очагов и распространенности возбудителя [13].

Таблица 1. Выявление антител к арбовирусам в сыворотках крови доноров Волгоградской области

Table 1. Detection of antibodies to arboviruses in the blood serum of donors in the Volgograd region

Административная территория Administrative territory	ЛЗН WNV		КЭ TBE	Укуниеми Ukuniemi	Синдбис Sindbis	КСГ CSG
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgG	IgG
Дубовский район/Dubovskiy district	1	1	0	0	0	0
Светлоярский район/Svetloyarsky district	0	4	1	0	0	0
Калачевский район/Kalachevsky district	1	3	0	1	1	0
г. Волгоград/Volgograd	12	17	1	0	1	1
Фроловский район/Frolovsky district	1	4	1	0	0	0
Кумылженский район/Kumylzhensky district	4	2	0	0	0	0
Октябрьский район/Octobersky district	6	1	0	0	0	0
Даниловский район/Danilovskiy district	4	1	0	0	0	0
Котельниково/Kotelnikovo	1	1	0	0	0	0
Клетский район/Kletskiy district	2	1	0	0	0	0
Сувоикинский район/Suvovikinskiy district	0	0	0	0	0	0
Количество исследованных проб/The number of investigated samples	404	404	279	92	92	92
Количество положительных проб/The number of positive samples	32	35	3	1	2	1
Уровень иммунной прослойки населения, % The level of the immune layer of the population, %	16,58		1,08	1,09	2,17	1,09

Например, у населения Астраханской области после эпидемической вспышки ЛЗН в 1999 г. произошло, по сравнению с 1998 г., увеличение иммунной прослойки с 31,6 до 50,0%. В октябре 1999 г. IgM к ВЗН были обнаружены у 3,1% практически здоровых жителей г. Астрахани, что свидетельствовало о недавно перенесенной инаппарантной форме ЛЗН. В целом, за 1998–1999 гг. в Астраханской области 51,9% жителей сельской местности и 35,0% горожан имели антитела к ВЗН. Но уже в декабре 2001 г. в трех обследованных районах Астраханской области процент доноров, серопозитивных к ВЗН, составлял 19,4 [12]. В аналогичных серологических скрининговых исследованиях в Волгоградской области в 2012 г. в различных административных районах было выявлено от 4 до 28,8% серопозитивных лиц среди доноров с наличием IgG к ВЗН, при этом было зарегистрировано всего 210 случаев заболевания. В 2013 г. процент доноров, имеющих в крови антитела к вирусу ЗН, снизился и составлял 10,46–14,0%, число зарегистрированных случаев заболевания ЛЗН равнялось 49 [14].

Отметим, что на территории Волгоградской области за 2017 г. официально не было зарегистрировано больных лихорадкой Западного Нила [10]. Вместе с тем, по результатам наших исследований, обнаружение в пробах сывороток доноров высокоавидных антител свидетельствует о перенесенной в прошлом инфекции (вероятно в эпидемический сезон 2017 г.).

Недостаточные объемы активного выявления больных и своевременной диагностики ЛЗН на территориях с установленной цирку-

ляцией вируса могут иметь неблагоприятные последствия при активизации эпидемического процесса.

По состоянию на 09.11.2018 г. в Волгоградской области за 2018 г. зарегистрировано 28 случаев заболевания ЛЗН, в том числе среди населения г. Волгограда — 18 случаев, г. Волжского — 2 случая, Среднеахтубинского района — 5 случаев, Городищенского района — 1 случай, Николаевского района — 1 случай, Серафимовичского района — 1 случай [10].

Статистика заболеваемости ЛЗН по районам имеет корреляцию с процентом выявленных положительных образцов крови доноров, проживающих на этих же административных территориях. Так, наибольший процент серопозитивных проб к ВЗН был выявлен среди сывороток крови доноров г. Волгограда (29 из 110, 26,3%) и Октябрьского района (7 из 25, 28%). Арбовирусные инфекции, такие как лихорадки Синдбис, Батаи, Тягиня, Инко, Укуниими, Бханджа, являются эндемичными для России [1, 4]. Роль вирусов Синдбис, Укуниими, Батаи, Инко, Тягиня в региональной заболеваемости и формировании популяционного иммунитета населения в настоящий момент мало изучены. Этиология таких, как правило, спорадических заболеваний остается нераспознанной врачами из-за нехарактерной клинической картины и отсутствия лабораторной диагностики [2, 11].

На содержание антител класса G к вирусам Синдбис, Укуниими, вирусам КСГ нами были исследованы 92 сыворотки крови доноров, проживающих в Волгоградской области. Как видно из таблицы 1, в одной пробе из 92 (1,09%)

Таблица 2. Количественное соотношение серопозитивных проб сывороток крови доноров Волгоградской области в зависимости от района проживания

Table 2. Quantitative ratio of seropositive blood serum samples from donors in the Volgograd region depending on the area of residence

Административная территория Administrative territory	Количество положительных проб/ количество исследованных проб Number of positive samples/ number of samples studied	% серопозитивных проб % seropositive samples	Месяц взятия проб Month of sampling
Дубовский район/Dubovskiy district	2/30	6,7	август/august
Светлоярский район/Svetloyarsky district	5/30	16,7	август/august
Калачевский район/Kalachevsky district	6/30	20,0	август/august
г. Волгоград/Volgograd	32/110	29,0	сентябрь/september
Фроловский район/Frolovsky district	6/34	17,6	октябрь/october
Кумылженский район/Kumylzhensky district	6/32	18,7	октябрь/october
Октябрьский район/Octobersky district	7/25	28,0	октябрь/october
Даниловский район/Danilovsky district	5/33	15,1	октябрь/october
Котельниково/Kotelnikovo	2/30	6,7	октябрь/october
Клетский район/Kletsy district	3/25	12,0	ноябрь/november
Суровикинский район/Surovinkinsky district	0/25	0	ноябрь/november
Итого/Total	74/404	18,32	

были обнаружены антитела к вирусам лихорадок Калифорнийской серогруппы и Укуниеми, в двух пробах из 92 (2,17%) — к вирусу лихорадки Синдбис.

В трех пробах из 279 были обнаружены IgM к вирусу клещевого энцефалита (1,08%). На территории Волгограда и области случаи заболевания клещевым энцефалитом в 2018 г. не были зарегистрированы. Содержание иммуноглобулинов класса М в крови говорит о возможной текущей или недавно перенесенной инфекции, либо о вакцинации, о которой донор не сообщил при медицинском осмотре.

Антитела к ВЗН были обнаружены в образцах сывороток крови доноров, проживающих во всех исследуемых административных районах области, за исключением Суровикинского. Специфические иммуноглобулины к вирусам Синдбис, Укуниеми и КСГ были выявлены в образцах сывороток крови доноров, проживающих в Калачевском районе и г.Волгограде. В таблице 2 приведено соотношение положительных проб по исследованным инфекциям к общему количеству проб.

Наибольший процент серопозитивных проб (29 и 28%) был выявлен среди сывороток крови доноров г. Волгограда и Октябрьского района. Наименьшее количество положительных проб — 2 (6,7%) из 30 — было из Дубовского и Котельниковского районов (табл. 2).

Далее мы проанализировали распределение доноров в зависимости от возраста, а также определили долю серопозитивных людей в каждой группе (табл. 3). Несмотря на то, что наибольшее количество исследованных сывороток крови с наличием иммуноглобулинов к арбовирусным инфекциям принадлежат людям возрастных групп 22–31 и 32–41 года (22 и 21 человек соответственно), данный показатель является абсолютным и обусловлен тем, что именно данные возрастные категории являются основными донорами (91 и 144 человека соответствен-

но). При анализе относительного показателя — доли серопозитивных людей в каждой возрастной группе — было установлено, что доля положительных образцов, принадлежащая людям 32–41-летнего возраста, равнялась 14,5% и была минимальной. Наибольший процент проб с наличием антител к ВЗН, Синдбис, Укуниеми и КСГ принадлежал донорам возрастной категории 52–61 лет и составлял 25%.

Основным недостатком, ограничивающим диагностическую ценность серологических методов, является антигенная перекрестная реактивность, которая существует между ВЗН и вирусом КЭ [18]. В нашей работе пробы сывороток крови доноров, в которых были обнаружены антитела к вирусу КЭ, проверяли на перекрестную реактивность к ВЗН. В результате в одном случае из трех была зарегистрирована серопозитивность к вирусу ЛЗН.

Заключение

Клинические проявления ЛЗН, лихорадок КСГ, Синдбис и Укуниеми разнообразны, тяжесть течения заболеваний варьирует от иннапаратной формы до осложненных менингоэнцефалитов, приводящих к летальному исходу [2, 11, 15]. Так как заболевания в 80% случаев протекают бессимптомно, зачастую факт перенесенного или текущего заболевания остается неустановленным. В связи с этим, помимо трансмиссивного пути передачи, появляется опасность передачи вируса при трансфузиологических манипуляциях [7, 17, 19]. Волгоградская область считается неэндемичной по заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ) из-за отсутствия природных условий для циркуляции его возбудителя. Интенсивность эпидемического процесса по клещевому энцефалиту в России за последнее десятилетие снизилась, однако увеличилось количество административных территорий в Центральном

Таблица 3. Количественное соотношение серопозитивных проб сывороток крови доноров Волгоградской области в зависимости от возраста

Table 3. The quantitative ratio of seropositive serum samples of blood donors in the Volgograd region, depending on age

Возраст доноров Age of donors	Количество проб Number of samples	Количество проб с антителами к ВЗН, Синдбис, Укуниеми и КСГ The number of samples with antibodies to WNV, Sindbis, Ukuniemi and CSG	Доля положительных проб в каждой возрастной категории, % The share of positive samples in each age category, %
18–21	34	5	14,7
22–31	91	22	24
32–41	144	21	14,5
42–51	82	13	15,8
52–61	52	13	25
62–71	1	0	0
Всего/Total	404	74	18,32

и Приволжском федеральных округах, где регистрируются единичные случаи заболевания людей, в основном связанные с присасыванием клещей при посещении эндемичных по КВЭ территорий других субъектов [9].

В целом доля проб сывороток крови доноров Волгоградской области с наличием антител к возбудителям арбовирусных инфекций составила 18,32%, из которых к ВЗН — 16,58%, вирусу КЭ — 1,08%, вирусам КСГ и Укуниими — по 1,09% и вирусу Синдбис — 2,17%. Наличие специфических антител у здорового населения области (доноров) свидетельствует о возмож-

но бессимптомно перенесенных заболеваниях. В связи с этим требуются дальнейшие исследования для установления роли перечисленных арбовирусов в региональной инфекционной патологии.

Таким образом, при проведении серологических исследований сывороток крови здоровых людей (доноров), собранных в августе–ноябре 2018 г., получены данные о наличии антител класса G к вирусам лихорадок Укуниими, Синдбис и КСГ, что предполагает циркуляцию этих возбудителей на территории Волгоградской области.

Список литературы/References

1. Альховский С.В., Дерябин П.Г., Гафарова И.Э., Самохвалов Е.И., Львов Д.К. Молекулярно-генетические методы детекции вирусов серокомплекса Калифорнийского энцефалита // Молекулярная медицина. 2010. № 5. С. 21–26. [Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G., Gafarova I.E., Samokhvalov E.I., L'vov D.K. Molecular genetic methods for detecting viruses of the California encephalitis serocomplex. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2010, no. 5, pp. 21–26. (In Russ.)]
2. Галимзянов Х.М., Василькова В.В., Кантемирова Б.И., Акмаева Л.Р. Арбовирусные комариные инфекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2016. № 4. С. 29–37. [Galimzyanov Kh.M., Vasilkova V.V., Kantemirova B.I., Akmaeva L.R. Arbovirus mosquito infections. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2016, no. 4, pp. 29–37. (In Russ.)]
3. Лукин Е.П. Лихорадка Синдбис // Медицинский академический журнал. 2009. Т. 9, № 3. С. 29–41. [Lukin E.P. Sindbis fever. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 29–41. (In Russ.)]
4. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: Медицина, 1989. 336 с. [Lvov D.K., Klimentov S.M., Gajdamovich S.Ja. Arboviruses and arbovirus infections. *Moscow: Medicine*, 1989. 336 p. (In Russ.)]
5. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкуллов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю., Куликова Л.Н., Сэвидж Г., Чимидова Н.М., Михалыева Л.Б., Васильев А.В., Галкина И.В., Прилипов А.Г., Кинни Р., Самохвалов Е.И., Бушкиева Б.Ц., Гублер Д., Альховский С.В., Аристов В.А., Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Москвина Т.М., Львов Д.Н., Злобина Л.В., Ляпина О.В., Садыкова Г.К., Шаталов А.Г., Усачев В.Е., Воронина А.Г., Лунева Л.И. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000–2002 гг.) // Вопросы вирусологии. 2004. № 3. С. 45–51. [Lvov D.K., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Gromashevsky V.L., Dzharzenov A.F., Shchelkanov M.Yu., Kulikova L.N., Savidge G., Chimidova N.M., Mikhalyayeva L.B., Vasilyev A.V., Galkina I.V., Prilipov A.G., Kinni R., Samokhvalov E.I., Bushkiyeva B.Ts., Gubler D., Alkhovskiy S.V., Aristov V.A., Deryabin P.G., Butenko A.M., Moskvina T.M., Lvov D.N., Zlobina L.V., Lyapina O.V., Sadykova G.K., Shatalov A.G., Usachyov V.E., Voronina A.G., Lunyova L.I. The specificity of circulation of West Nile Virus (Flaviviridae, Flavivirus) and of some other arboviruses in the ecosystems of Volga delta, Volga-Akhtuba flood-lands and adjoining arid regions (2000–2002). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2004, no. 3, pp. 45–51. (In Russ.)]
6. Манаков В.В., Смелянский В.П., Антонов В.А., Пашанина Т.П., Погасий Н.И., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Савченко С.Т., Русакова Н.В., Фролова Г.И. Эпидемиологический мониторинг арбовирусных инфекций на территории Волгоградской области // Журнал инфекционной патологии. 2009. Т. 16, № 3. С. 145–146. [Manakov V.V., Smelyansky V.P., Antonov V.A., Pashanina T.P., Pogasiy N.I., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Savchenko S.T., Rusakova N.V., Frolova G.I. Epidemiological monitoring of arbovirus infections in the territory of the Volgograd Region. *Zhurnal Infektsionnoy Patologii = Journal of Infectious Pathology*, 2009, vol. 16, no. 3, pp. 145–146. (In Russ.)]
7. Михайлова А.А., Самойлова Т.И. Современное представление об ареале вируса Западного Нила // Медицинский журнал. 2008. Т. 3, № 25. С. 19–23. [Mikhailova A.A., Samoiloova T.I. A modern view of the range of the West Nile virus. *Meditsinskiy zhurnal = Medical Journal*, 2008, vol. 3, no. 25, pp. 19–23. (In Russ.)]
8. Монастырский М.В., Шестопалов Н.В., Акимкин В.Г., Демина Ю.В. Опыт осуществления эпидемиологического надзора за лихорадкой Западного Нила на территории Волгоградской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 1. С. 49–55. [Monastyrsky M.V., Shestopalov N.V., Akimkin V.G., Demina Yu.V. The experience of epidemiological surveillance of West Nile fever in the Volgograd region. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2015, vol. 20, no. 1, pp. 49–55. (In Russ.)]
9. Носков А.К., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Веригина Е.В., Иннокентьева Т.И., Балахонов С.В. Клещевой вирусный энцефалит в Российской Федерации: особенности эпидемического процесса в период устойчивого спада заболеваемости, эпидемиологическая ситуация в 2016 г., прогноз на 2017 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 1. С. 37–43. [Noskov A.K., Nikitin A.Y., Andaev E.I., Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Innokent'eva T.I., Balakhonov S.V. Tick-borne virus encephalitis in the Russian Federation: features of epidemic process in steady morbidity decrease period: epidemiological condition in 2016 and the forecast for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 1, pp. 37–43. doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-37-43 (In Russ.)]

10. Об эпидемиологической ситуации по заболеваемости лихорадкой Западного Нила и мерах профилактики на 05.09.2018 г. [On the epidemiological situation of incidence of West Nile fever and preventive measures for 05.09.2018]. URL: <http://34.rospotrebnadzor.ru/content/187/9106> (20.09.2019)
11. Самойлова Т.И. Арбовирусные инфекции и биотерроризм // Военная медицина. 2017. № 4. С. 106–110. [Samoilova T.I. Arbovirus infections and bioterrorism. *Voennaya meditsina = Military Medicine*, 2017, no. 4, pp. 106–110. (In Russ.)]
12. Шишкина Е.О., Бутенко А.М., Гайдамович С.Я., Ларичев В.Ф., Журавлев В.И., Щербаклова С.А., Ковтунов А.И., Джаркенов А.Ф., Ситков В.Г., Донская М.Г. Изучение иммуноструктуры населения Астраханской области к вирусу Западного Нила в 1998 и 1999 гг. // Вопросы вирусологии. 2002. № 6. С. 13–17. [Shishkina E.O., Butenko A.M., Gaydamovich S.Ya. Larichev V.F., Zhuravlev V.I., Shcherbakova S.A., Kovtunov A.I., Dzharzenov A.F., Sitkov V.G., Donskaya M.G. The study of the immune structure of the population of the Astrakhan region to the West Nile virus in 1998 and 1999. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2002, no. 6, pp. 13–17. (In Russ.)]
13. Щербаклова С.А., Найденова Е.В., Билько Е.А., Водина Е.А., Логунова Т.Е., Потемина Л.П., Кутырев В.В. Выявление специфических антител к арбовирусам в сыворотках крови людей, проживающих на территории Саратовской области // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. Т. 2, № 108. С. 72–74. [Shcherbakova S.A., Naidenova E.V., Bil'ko E.A., Vodina E.A., Logunova T.E., Potemina L.P., Kutyrev V.V. Detection of specific antibodies to Arboviruses in blood sera of people living in the territory of the Saratov Region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, vol. 2, no. 108, pp. 72–74. doi: 10.21055/0370-1069-2011-2(108)-72-74 (In Russ.)]
14. Эпидемиологическая ситуация по лихорадке Западного Нила (ЛЗН) в Волгоградской области, меры профилактики. [The epidemiological situation of West Nile fever (WNF) in the Volgograd region, preventive measures]. URL: <http://34.rospotrebnadzor.ru/content/187/7306> (20.09.2019)
15. Adouchief S., Smura T., Sane J., Vapalahti O., Kurkela S. Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Rev. Med. Virol.*, 2016, vol. 26, no. 4, pp. 221–241. doi: 10.1002/rmv.1876
16. Al-Jabi S.W. Global research trends in West Nile virus from 1943 to 2016: a bibliometric analysis. *Global. Health*, 2017, no. 13: 55. doi: 10.1186/s12992-017-0284-y
17. Hubálek, Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.*, 2008, vol. 103, pp. 29–43. doi: 10.1007/s00436-008-1064-7
18. Sanchini A., Donoso-Mantke O., Papa A., Sambri V., Teichmann A., Niedrig M. Second International diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. 2013. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013, vol. 7, iss. 4. doi: 10.1371/journal.pntd.0002184
19. Tingström O., Wesula Lwande O., Näslund J., Spyckerelle I., Engdahl C., Von Schoenberg P., Ahlm C., Evander M., Bucht G. Detection of Sindbis and Inkoo virus RNA in genetically typed mosquito larvae sampled in Northern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2016, vol. 16, no. 7, pp. 461–467. doi: 10.1089/vbz.2016.1940

Авторы:

Негоденко А.О., научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Лучинин Д.Н., научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Коновалов П.Ш., исполняющий обязанности главного врача ГБУЗ Волгоградский областной центр крови, г. Волгоград, Россия;
Павлюкова О.А., зам. главного врача по медицинской части ГБУЗ Волгоградский областной центр крови, г. Волгоград, Россия;
Скрынникова Е.А., зав. отделом комплектования донорских кадров ГБУЗ Волгоградский областной центр крови, г. Волгоград, Россия;
Прилепская Д.Р., младший научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Молчанова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Баркова И.А., к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории оперативной диагностики бактериальных и вирусных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Викторов Д.В., д.б.н., доцент, зам. директора по научно-экспериментальной работе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Топорков А.В., д.м.н., директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Negodenko A.O., Researcher, Arbovirus Infection Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Luchinin D.N., Researcher, Arbovirus Infection Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Konovalev P.Sh., Acting Chief Physician, Volgograd Regional Blood Center, Volgograd, Russian Federation;
Pavlyukova O.A., Deputy Chief Medical Officer, Volgograd Regional Blood Center, Volgograd, Russian Federation;
Skrynnikova E.A., Head of the Donor Recruitment Department, Volgograd Regional Blood Center, Volgograd, Russian Federation;
Prilepskaya D.R., Junior Researcher, Arbovirus Infection Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Molchanova E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Arbovirus Infection Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Barkova I.A., PhD (Medicine), Laboratory for the Operative Diagnosis of Bacterial and Viral Infections, Associate Professor, Senior Researcher, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Viktorov D.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Science, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Toporkov A.V., PhD, MD (Medicine), Director, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.05.2019
 Отправлена на доработку 24.05.2019
 Принята к печати 23.08.2019

Received 23.05.2019
 Revision received 24.05.2019
 Accepted 23.08.2019

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП ДЛЯ АНАЛИЗА УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕТРАЦИКЛИНУ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *NEISSERIA GONORRHOEAЕ* В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.И. Дементьева¹, Б.Л. Шаскольский¹, А.Т. Лейнсоо¹, Д.А. Грядунов¹,
Н.П. Петрова², А.В. Честков², А.А. Кубанов², Д.Г. Дерябин²

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Проанализированы фенотипическая чувствительность и генетические детерминанты резистентности к тетрациклину у 399 клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, собранных в различных регионах РФ в 2015–2017 гг. Оценку фенотипической устойчивости проводили методом серийных разведений в агаре и оценивали по критериям МУК 4.2.1890-04, фиксируя значения минимальной подавляющей концентрации (МПК). Для анализа генетических маркеров резистентности использовали гидрогелевый биочип с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами, позволяющий одновременно детектировать ряд хромосомных мутаций и наличие плазмидного гена *tetM*, ассоциированных с резистентностью *N. gonorrhoeae* к тетрациклину. Детерминанты устойчивости были идентифицированы у 193 изолятов (48,4%). Наиболее часто встречались замены в кодоне 57 гена *rpsJ* (41,2%), уменьшающие аффинность тетрациклина к 30S субъединице рибосомы, в основном, мутация Val57Met, как в виде одиночной замены, так и в сочетании с другими мутациями. Замены в данном гене приводили к появлению умеренно-резистентных штаммов. Второй по частоте встречаемости (23,1%) оказались мутации в гене *porB* (нарушение поступления антибиотика в клетку); при этом замена Gly120Lys, как правило, приводила к появлению резистентности к тетрациклину, как в случае единичной мутации, так и в совокупности с другими заменами. Другие мутации в кодоне 120 (Gly на Asp, Asn или Thr), а также замены Ala121 на Asp, Asn и Gly оказывали значительно меньшее влияние на уровень устойчивости. У 11,3% штаммов наблюдалась делеция аденина в –35 положении в промоторной области гена *mtrR* (увеличение экспрессии помпы эффлюкса MtrC–MtrD–MtrE). Ген *tetM* был выявлен в 27 изолятах, в том числе, американского типа — в 17 штаммах, голландского типа — в 10, для которых построено филогенетическое дерево с оценкой гомологии с аналогичными генами у микроорганизмов из родов *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Mycoplasma*. Мутации в хромосомных генах приводили к увеличению МПК тетрациклина до 2–4 мг/л; максимальную МПК — 4 мг/л наблюдали при одновременном присутствии нескольких мутаций. Изоляты, несущие плазмиду с геном *tetM*, демонстрировали высокий уровень устойчивости (МПК ≥ 8 мг/л, у двух образцов — 64 мг/л). Долговременный отказ от использования тетрациклина для лечения гонококковой инфекции (с 2003 г.) привел к снижению доли резистентных

Адрес для переписки:

Дементьева Екатерина Игоревна
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.
Тел.: 8 (499) 135-98-46 (служебн.).
E-mail: kdem@biochip.ru

Contacts:

Ekaterina I. Dementieva
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilova str., 32, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
Phone: +7 (499) 135-98-46 (office).
E-mail: kdem@biochip.ru

Библиографическое описание:

Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Лейнсоо А.Т., Грядунов Д.А., Петрова Н.П., Честков А.В., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Биологический микрочип для анализа устойчивости к тетрациклину клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 750–762. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-750-762

Citation:

Dementieva E.I., Shaskolskiy B.L., Leinsoo A.T., Gryadunov D.A., Petrova N.P., Chestkov A.V., Kubanov A.A., Deryabin D.G., Biological microchip for assessing tetracycline-resistance in *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 750–762. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-750-762

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-20039) и Государственного задания Минздрава России (№ 056-00015-18-00).

© Дементьева Е.И. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-5-6-750-762>

штаммов, включая умеренно резистентные, с 75 до 45,4%, однако устойчивость к тетрациклину в настоящее время в РФ остается на высоком уровне, что определяется сохранением различных детерминант резистентности у половины изолятов в исследованной выборке.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, тетрациклин, генетические детерминанты резистентности, хромосомные мутации, ген *tetM*, биочип, минимальная подавляющая концентрация.

BIOLOGICAL MICROCHIP FOR ASSESSING TETRACYCLINE-RESISTANCE IN *NEISSERIA GONORRHOEAE* CLINICAL ISOLATES IN RUSSIAN FEDERATION

Dementieva E.I.^a, Shaskolskiy B.L.^a, Leinsoo A.T.^a, Gryadunov D.A.^a, Petrova N.P.^b, Chestkov A.V.^b, Kubanov A.A.^b, Deryabin D.G.^b

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^b State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Abstract. A total of 399 *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates collected in different regions of the Russian Federation in 2015–2017 were analyzed for tetracycline susceptibility and genetic markers of resistance. Drug susceptibility testing was performed by serial dilution method in agar and minimum inhibitory concentration (MIC) was measured according to the Russian “Guidelines for microbial susceptibility testing for antibacterial agents No. 4.2.1890-04”. Tetracycline resistance determinants were studied by using hydrogel microarray with immobilized oligonucleotide probes able to identify a series of chromosomal mutations and detect plasmid *tetM* gene. Different resistance determinants were found in 193 isolates (48.4%). Mutation in codon 57 in the *rpsJ* gene (41.2%) was most common that decreases tetracycline affinity to ribosome 30S subunit, mainly due to Val57Met substitution both as a point mutation as well as in combination with others. Mutations in the *rpsJ* gene were found in strains with the intermediate tetracycline susceptibility. Mutations in the *porB* gene (lower tetracycline influx) held the second place in prevalence pattern (23.1%); the Gly120Lys substitution usually led to emergence of tetracycline resistance either as a point mutation or in combination with other substitutions. Substitutions of Gly120 for other residues (Asp, Asn, and Thr) and Ala121 for Asp, Asn, and Gly had much less effect on resistance level. The –35 delA deletion in the promoter region of *mtrR* gene (increased expression of MtrC–MtrD–MtrE efflux pump) was observed in 11.3% strains. The *tetM* gene was found in 27 strains including 17 American and 10 Dutch type *tetM* determinants. Evolutionary tree was constructed for the *tetM* genes with the estimation of their homology with similar genes in genera *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Mycoplasma*. Mutations in chromosomal genes resulted in increase of tetracycline MIC up to 2–4 mg/L; 4 mg/L MIC was observed in case of simultaneous presence of several mutations. Strains bearing *tetM* gene-containing plasmid showed extremely high resistance level: MIC ≥ 8 mg/L (64 mg/L for the two samples). Thus, long-lasting withdrawal of tetracycline use for treatment of gonococcal infections in Russia (since 2003) resulted in decreased percentage of resistant strains (including strains with intermediate susceptibility) from 75% down to 45.4%. However, currently tetracycline resistance in Russia remains elevated that is explained by the presence of different resistance determinants in the half of isolates under study.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, tetracycline, genetic resistance determinants, chromosomal mutations, *tetM* gene, microarray, minimum inhibitory concentration.

Введение

ДНК-микрочипы — массивы иммобилизованных на твердой фазе олигонуклеотидных зондов, способных специфично связываться с детектируемыми последовательностями, в настоящее время стали востребованным инструментом проведения многопараметрического анализа [3, 22], в том числе обеспечивающим одновременную идентификацию генетических детерминант резистентности бактериальных патогенов к широкому спектру антимикробных препаратов. В ИМБ РАН разработаны и успешно используются биологические микрочипы (биочипы) на основе гидрогелей для видовой идентификации микобактерий, обнаружения генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза [26, 32, 33], генотипиро-

вания вируса гепатита С [16], анализа генома вируса гриппа, включая выявление состояния генетических маркеров, детерминирующих патогенность вируса и его устойчивость к противовирусным препаратам [2]. Технология гидрогелевых биочипов также была использована для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта человека с одновременным анализом генетических детерминант устойчивости к антимикробным препаратам [4, 5, 18].

Перспективным направлением расширения сферы применения гидрогелевых биочипов низкой плотности представляется исследование детерминант резистентности возбудителя гонококковой инфекции — *Neisseria gonorrhoeae*, входящего в список приоритетных бактериальных патогенов по версии ВОЗ от 27 февраля 2017 г. [13]. Возбудитель гонореи относится к микроорганизмам, которые способны быстро

накапливать мутации и приобретать резистентность к лекарственным препаратам, в том числе множественную лекарственную устойчивость. В настоящее время в мире выявлены изоляты *N. gonorrhoeae*, устойчивые ко всем основным препаратам, используемым для лечения гонореи, включая сульфаниламиды, β -лактамы, тетрациклины, фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды [28, 30]. Для проведения успешной терапии заболевания и предотвращения распространения лекарственно-устойчивых форм необходим мониторинг чувствительности *N. gonorrhoeae* к основным противомикробным препаратам, когда-либо используемым для терапии гонококковой инфекции.

Одной из групп подобных препаратов являются тетрациклины, широко применявшиеся во всем мире для лечения гонореи в 1960–1980 гг. Однако устойчивость к тетрациклинам сформировалась довольно быстро: появились данные об увеличении МПК тетрациклина для многих штаммов *N. gonorrhoeae*, что объяснялось возникновением мутаций в генах хромосомной локализации. Появление плазмидной детерминанты *tetM* в середине 80-х гг. годов в США [24] и Голландии [12] (американский и голландский тип), вызывающее значительный рост МПК тетрациклина (более 8 мг/л), и ее быстрое распространение по всему миру привели к прекращению использования тетрациклина для лечения гонококковой инфекции.

В России препараты тетрациклинового ряда (тетрациклин, доксициклин) использовались дольше. Лишь в приказе Минздрава № 415 от 20.08.2003 г. «Протокол ведения больных, гонококковая инфекция» тетрациклин перестал указываться в списке препаратов для лечения локализованной гонококковой инфекции и гонококкового фарингита [8]. По результатам, полученным в рамках системы мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* в РФ (известна под названием RU-GASP (Russian Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Programme), в 2005–2009 гг. доля резистентных к тетрациклину штаммов *N. gonorrhoeae* в среднем по РФ превышала 75% [1, 6, 9].

Современный этап контроля чувствительности гонококка к тетрациклинам является актуальным по нескольким причинам. Во-первых, для детального понимания механизмов устойчивости необходимо знать, как меняются частоты генетических детерминант резистентности в условиях, когда препарат (в данном случае тетрациклин) не применялся для терапии в течение некоторого количества лет (в данном случае с 2003 г.). Во-вторых, рост устойчивости гонококков ко всему спектру используемых лекарственных препаратов диктует необходимость получения новых лекарств, и, возмож-

но, препаратов на основе ранее используемых. Так, разработаны новые синтетические препараты группы тетрациклинов — тетрациклины третьего поколения, например, тигециклин (глицилциклин), омадациклин (аминометилциклин), эравациклин (фторциклин), которые потенциально применимы для терапии гонококковой инфекции [20, 25].

Установлено, что детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклину включают как хромосомные мутации, так и экспрессию плазмидного белка TetM [17, 25, 30], а именно:

- специфические мутации гена *rpsJ*, кодирующего белок S10, приводящие к заменам Val57Met или Val57Leu, которые снижают аффинность тетрациклина к 30S субъединице рибосомы;
- мутации гена *penB* (*porB*), кодирующего белок-порин PorB1b (остатки Gly120, Ala121), приводящие к уменьшению поступления antimicrobных препаратов, включая тетрациклин, в бактериальную клетку;
- мутации гена *mtrR*, вызывающие увеличение экспрессии помпы эффлюкса MtrC-MtrD-MtrE, в частности, мутации в промоторной области: инсерции T и TT в положении –10 и делеция A в положении –35;
- наличие конъюгативной плазмиды, несущей ген *tetM*, размером 25,2 MDa (40,6 тыс. п.о.) [23]. Плазмидный белок TetM, сходный по структуре с фактором элонгации EF-G, блокирует сайт связывания тетрациклина на рибосоме, делая ее практически недоступной для взаимодействия с антибиотиком.

Экспрессия плазмидного белка TetM приводит к наибольшей устойчивости к тетрациклинам (МПК 8 мг/л и выше). Хромосомные мутации не вызывают настолько существенного увеличения МПК, однако показано, что триада мутаций *mtrR-porB-rpsJ* обладает высокой эффективностью, приводя к клинически значимому повышению уровня устойчивости [17].

Следует отметить, что спектр геномных маркеров устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклину определен достаточно точно, в частности, недавно проведенный полногеномный анализ клинических изолятов *N. gonorrhoeae* с использованием платформы Oxford Nanopore для выявления детерминант резистентности к antimicrobным препаратам включал те же вышеуказанные гены-мишени и наличие плазмиды *tetM* [15].

Целью настоящей работы являлась оценка уровня устойчивости к тетрациклину в современной российской популяции гонококковой инфекции посредством анализа фенотипической чувствительности и идентификации генетических детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* в клинических изолятах, полученных в различных регионах Российской Федерации в 2015–2017 гг.

Материалы и методы

Клинические изоляты *N. gonorrhoeae*. В работе исследованы 399 клинических изолятов *N. gonorrhoeae* (уретральные и цервикальные образцы от женщин и уретральные материалы от мужчин), поступивших в 2015–2017 гг. в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России из специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля 16 субъектов Российской Федерации (Архангельская, Астраханская, Брянская, Калужская, Новосибирская, Омская, Пензенская, Псковская, Рязанская, Томская и Челябинская области, г. Москва, Ставропольский край, Республика Татарстан, Республика Тыва и Чувашская Республика). Первоначальный посев поступивших культур проводили на шоколадный агар с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex и 1% селективной добавки VCAT (Becton Dickinson, США). Далее колонии микроскопировали и исследовали с использованием оксидазного теста. Верификацию культур проводили по совокупности биохимических активностей с использованием NH-карт на анализаторе «VITEK 2 Compact» (bioMérieux, Франция). Культуры, показавшие результаты «отлично» (96–99%) и «очень хорошо» (93–95%), идентифицировали как образцы *N. gonorrhoeae*. Для образцов с результатами (вероятностью) менее 93% осуществляли дополнительную масс-спектрометрическую идентификацию микроорганизма на времяпролетном масс-спектрометре с ионизацией «MALDI Microflex» (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Выделение ДНК из чистых культур *N. gonorrhoeae* проводили с использованием экспресс-наборов для выделения ДНК (НПФ «Литех», Москва) и хранили при -20°C .

Определение фенотипической чувствительности *N. gonorrhoeae* к тетрациклину. Чувствительность *N. gonorrhoeae* к тетрациклину анализировали методом серийных разведений, используя в качестве основы шоколадный агар с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex, определяя значения минимальных подавляющих концентраций (МПК, мг/л). При интерпретации результатов значения определенных МПК сравнивали с критериями МУК 4.2.1890-04 [7]. Согласно данным критериям, исследуемые штаммы *N. gonorrhoeae* относили к категории Ч — чувствительные (МПК $\leq 0,25$ мг/л), У/Р — умеренно резистентные/промежуточно чувствительные (МПК = 0,5–1 мг/л), Р — резистентные (МПК ≥ 2 мг/л).

Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе и праймеры для амплификации. Конструирование олигонуклеотидов для иммобилизации на биочипе и праймеров для проведения ПЦР-амплификации проводили, как описано

ранее [32, 33]. Синтез олигонуклеотидов для иммобилизации на биочипе и праймеров для амплификации проводили на автоматическом синтезаторе «ABI-394 DNA/RNA synthesizer» (Applied Biosystems, США) с использованием стандартного фосфорамидитного метода и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (комплекс «Gilson», Франция). В процессе синтеза в олигонуклеотидные зонды вводили спейсер со свободной аминогруппой с использованием 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research, США).

Гидрогелевый биочип для анализа мутаций, приводящих к устойчивости к антимикробным препаратам. В работе использовали биочип, разработанный ранее в ИМБ РАН, для одновременного обнаружения 12 возбудителей инфекций репродуктивного тракта человека (*N. gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus mulieris*, *Bacteroides fragilis* и *Fusobacterium nucleatum*) с одновременным анализом генетических маркеров устойчивости к антимикробным препаратам [5] с модификациями, обеспечивающими идентификацию расширенного спектра детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* к тетрациклину. Схема биочипа представлена на рисунке 1. Микрочип включал 143 гидрогелевых элемента:

- элементы, содержащие иммобилизованные зонды, соответствующие видоспецифичному полиморфизму гена 16S рРНК, для идентификации 12 возбудителей;
- элементы, содержащие иммобилизованные зонды, специфичные к дикому типу и мутантным вариантам последовательностей генов, являющихся детерминантами резистентности возбудителей к антимикробным препаратам, включающим гены *penA*, *penA*, *bla*_{TEM} (устойчивость к β -лактамам); 16S рРНК, *rpsJ*, *tetM* (устойчивость к тетрацикламам); 23S рРНК, *mefA* (устойчивость к макролидам); *gyrA*, *parC* (устойчивость к фторхинолонам); *nimB-nimG*, *ntr4tv/ntr6tv* (устойчивость к метронидазолу);
- элементы, содержащие иммобилизованные зонды для идентификации мутаций в генах *porB* и *mtrR* (инсерции Т и ТТ в положении -10 и делеция А в положении -35 промоторной области), отвечающих за проникновение в клетку и эффлюкс ряда лекарственных препаратов;
- элементы с индексом «0», не содержащие иммобилизованных зондов и используемые для вычисления фонового сигнала.

В сравнении с ранее описанным биочипом [5], в его структуру были добавлены олигонуклеотиды для определения мутаций в кодонах 120 и 121 гена *porB*, а также зонд для детекции гена

tetM, являющийся универсальным для выявления американского и голландского вариантов.

Биочипы на основе гидрогелей изготавливали по ранее описанной методике [33].

Проведение анализа ДНК *N. gonorrhoeae* с использованием биочипа. Процедура анализа образцов ДНК *N. gonorrhoeae* включала (а) мультиплексную ПЦР с использованием специфичных праймеров и флуоресцентного субстрата — конъюгата дезоксиуридинтрифосфата и красителя индодикарбоцианинового ряда — аналога Су5, в ходе которой осуществлялась амплификация и флуоресцентное маркирование целевых фрагментов генома; (б) гибридизацию флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов на биочипе с образованием гибридизационных комплексов в элементах биочипа; (в) регистрацию сигналов в элементах биочипа и интерпретацию результатов гибридизации.

Амплификацию и гибридизацию проводили по описанной ранее методике [5].

Регистрацию флуоресцентных изображений ДНК-чипов (гибридизационных картин) выполняли на универсальном аппаратно-программном комплексе (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) для анализа биологических микрочипов с использованием специализированного программного обеспечения ImageWare® (ООО «БИОЧИП-ИМБ»). Принадлежность анализируемой ДНК к виду *N. gonorrhoeae* устанавливали при наличии положительного сигнала элемента биочипа, содержащего зонд, соответствующий видоспецифичной последовательности гена 16S рРНК (рис. 1: элементы *N. gonorrhoeae* в группе элементов для идентификации). Идентификацию точечных мутаций в генах *rpsJ*, *porB*, *mtrR* проводили, сравнивая интенсивности сигналов в соответствующих группах элементов с олигонуклеотидами, соответствующими дикому типу и мутантным вариантам данных генов. Присутствие гена *tetM* в анализируемой ДНК определяли по наличию сигнала в соответствующей ячейке, превышающего среднее значение сигналов в элементах, не содержащих иммобилизованных зондов «0», не менее чем в 4,0 раза. Флуоресцентные изображения биочипов после проведения анализа представлены на рисунке 2.

Определение диагностической чувствительности и специфичности биологических микрочипов. Диагностическую чувствительность S_n и специфичность S_p при анализе резистентности клинических изолятов *N. gonorrhoeae* к тетрациклину с использованием биологических микрочипов рассчитывали, сравнивая результаты, полученные на микрочипах, с результатами фенотипического анализа. Устанавливали следующие критерии для результатов:

— истинноположительные (Тр): обнаружены мутации, приводящие к резистентности —

образцы являются резистентными (Р) или умеренно-резистентными (У/Р) к тетрациклину;

— истинноотрицательные (Тн): не обнаружены мутации, приводящие к резистентности — образцы являются чувствительными к тетрациклину;

— ложноположительные (Фр): обнаружены мутации, приводящие к резистентности — образцы являются чувствительными к тетрациклину;

— ложноотрицательные (Fn): не обнаружены мутации, приводящие к резистентности — образцы являются резистентными (Р) или умеренно-резистентными (У/Р) к тетрациклину.

S_n и S_p рассчитывали по формулам:

$$S_n = \frac{T_p}{T_p + F_n} \times 100\%; \quad (1)$$

$$S_p = \frac{T_n}{T_n + F_p} \times 100\%. \quad (2)$$

Секвенирование фрагментов генома *N. gonorrhoeae*. Секвенирование ДНК *N. gonorrhoeae* проводили в ЦКП «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов «ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1» (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе «Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer».

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов соответствующих локусов генома *N. gonorrhoeae* использовали для подтверждения результатов анализа на биочипах. Для всех образцов, в которых был обнаружен плазмидный ген *tetM*, проводили его секвенирование с целью отнесения аллеля к американскому или голландскому типу. Установление последовательности гена *tetM* проводили с праймерами: 5'-²⁰⁸⁹CCG ACT ATT TGG ACG ACG GG²¹⁰⁸-3' (прямой), 5'-¹³³⁹GTG ACC CGC TTC TGC GAT ATT¹³⁵⁹-3' (обратный), 5'-¹³³⁹AAT ATC GCA GAA GCG GGT CAC¹³⁵⁹-3' (прямой), 5'-⁹⁶⁰GGT CAG TCT GAA CTT TGC GG⁹⁷⁹-3' (обратный), 5'-¹¹⁴⁷ACA ATT TCC CCG GAA TAA GCC T¹¹⁶⁸-3' (прямой), 5'-³²⁷GGA AGC GTG GAC AAA GGT ACA³⁴⁷-3' (обратный). Для американского аллеля *tetM* (GenBank Acc. No L12241) использовали праймеры 5'-¹⁵⁷⁴CTT CCC AAC GGA AGC GGT GAT¹⁵⁹⁴-3' (прямой), 5'-⁹⁶⁰GGT CCG TCT GAA CTT TGC GG⁹⁷⁹-3' (обратный), для голландского аллеля *tetM* (GenBank Acc. No L12242) — 5'-¹⁵⁷⁵CTC CCT AAT GGA AGC GGT GC¹⁵⁹⁴-3' (прямой), 5'-⁹⁶⁰GGT CAG TCT GAA CTT TGC GG⁹⁷⁹-3' (обратный).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей. Филогенетический анализ с построением филогенетических деревьев про-

водили методом максимального правдоподобия на основе модели Тамуры–Неи [29] с использованием программного обеспечения MEGA7 [19].

Результаты

Проведено исследование фенотипической чувствительности и генетических детерминант резистентности к тетрациклину 399 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в различных регионах России в 2015–2017 гг. Анализ фенотипических характеристик современной российской популяции гонококковой инфек-

ции позволил выявить 75 штаммов, резистентных к тетрациклину (18,8%), 106 умеренно-резистентных изолята (26,6%) и 218 штаммов (54,6%), чувствительных к данному препарату. Используя метод гибридизации на биочипе было идентифицировано 193 штамма, обладающих различными детерминантами, ассоциированными с резистентностью к тетрациклину (табл. 1). Следует отметить, что у 10 штаммов с МПК тетрацилина ≥ 1 мг/л ни с помощью микрочипов, ни методом таргетного секвенирования не обнаружено известных мутаций, приводящих к резистентности, что требует их

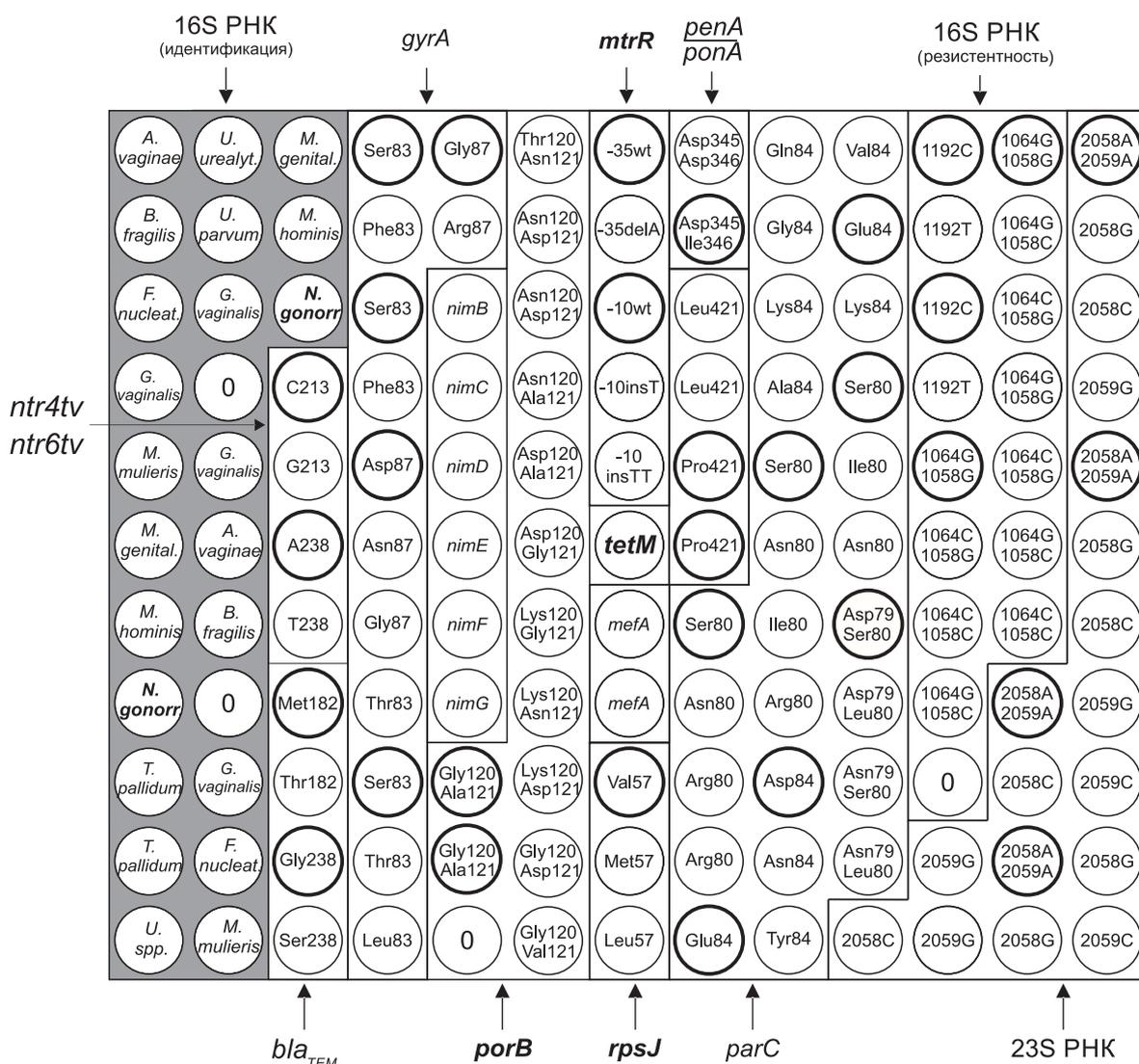


Рисунок 1. Схема расположения элементов на биочипе. Микрочип содержит видоспецифические зонды, выбранные из соответствующих последовательностей гена 16S рPHK для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта (выделено серым), включая *N. gonorrhoeae*, и зонды для анализа детерминант устойчивости к антимикробным препаратам. Элементы, содержащие олигонуклеотиды, соответствующие ДНК дикого типа, обведены черным контуром

Figure 1. Hybridization microarray configuration. Biochip contained species-specific oligonucleotide probes derived from 16S RNA gene sequences for identification of causative agents of reproductive tract infections (marked in grey), including *N. gonorrhoeae*, and oligonucleotide probes for analysis of resistance determinants. Biochip elements with oligonucleotides matching the wild-type sequence are marked with bold circles

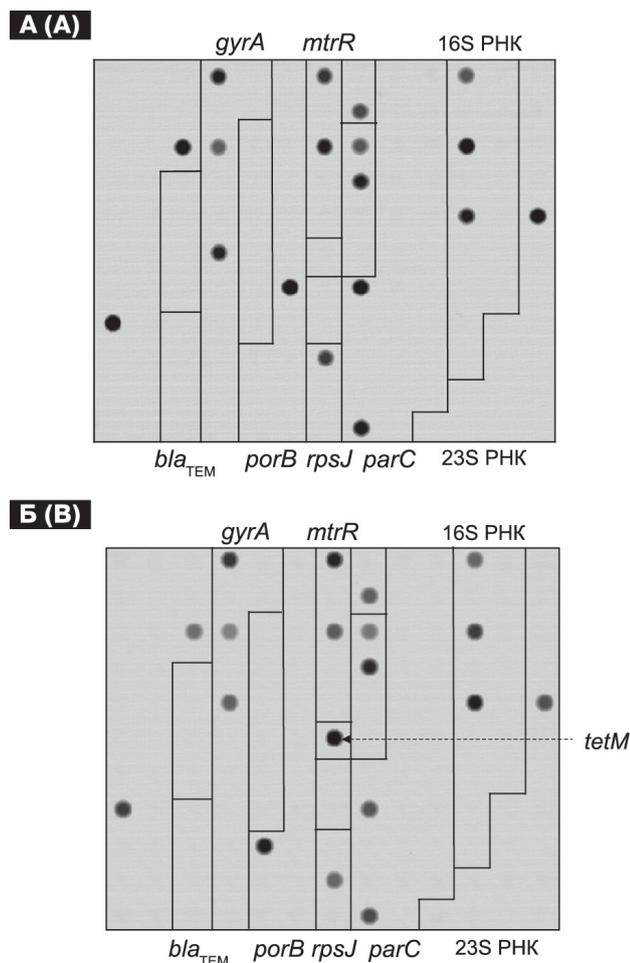


Рисунок 2. Флуоресцентные изображения микрочипов после проведения анализа образцов ДНК *N. gonorrhoeae*

Figure 2. Analysis of *N. gonorrhoeae* drug resistance markers by hybridization on a microarray (fluorescence image)

А. Результат анализа ДНК *N. gonorrhoeae*. Обнаружена мутация в гене поринового белка *porB* Gly120Lys, приводящая к устойчивости к антибиотикам пенициллинового ряда, тетрациклинам, макролидам, цефалоспорином. Дополнительно: обнаружена мутация в гене *gyrA* Asp87Asn (нумерация *E. coli*), приводящая к устойчивости к фторхинолонам. Б. Результат анализа ДНК *N. gonorrhoeae*. Обнаружена замена Val57Met в гене *rpsJ*, установлено наличие плазмидного гена *tetM*, ассоциированные с устойчивостью к тетрациклину. Дополнительно: обнаружена мутация в гене *parC* Ser80Asn (нумерация *E. coli*), приводящая к устойчивости к фторхинолонам.

A. The sample contained *N. gonorrhoeae* DNA. Hybridization analysis revealed the following mutations: Gly120Lys in the *porB* gene (resistance to penicillins, tetracyclines, macrolides, cephalosporins) and (additionally) Asp87Asn (numeration according to *E. coli*) in *gyrA* gene (resistance to fluoroquinolones). B. The sample contained *N. gonorrhoeae* DNA. Hybridization analysis revealed the presence of the plasmid *tetM* gene and the following mutations: Val57Met in the *rpsJ* gene (resistance to tetracyclines) and (additionally) Ser80Asn (numeration according to *E. coli*) in *gyrA* gene (resistance to fluoroquinolones).

углубленного исследования, в том числе с использованием технологии полногеномного секвенирования.

Фенотипически устойчивые к тетрациклину изоляты строго разделялись на 2 группы: штаммы, имеющие хромосомные мутации, для которых МПК тетрациклина не превышала 4 мг/л, и штаммы, несущие плазмиду с геном *tetM*, с высоким уровнем устойчивости (МПК ≥ 8 мг/л).

Анализ хромосомных детерминант резистентности к тетрациклину

В исследуемой выборке наиболее часто встречались мутации, приводящие к замене аминокислоты в кодоне 57 гена *rpsJ* хромосомной локализации (41,2%), в основном, замена Val57Met (табл. 2). Штаммы, несущие единичную замену Val57Met/Leu, являлись, как правило, умеренно резистентными (МПК 0,5–1 мг/л у 41 из 47 штаммов), 3 изолята были резистентны с МПК 2 мг/л. Мутации в гене *rpsJ* в совокупности с заменами в гене *porB* или делецией в промоторной области *mtrR* также приводили, в основном, к появлению умеренно резистентных штаммов (табл. 1).

Второй по частоте встречаемости оказались мутации в гене *porB*. Замена Gly120Lys, как правило, приводила к появлению резистентности к тетрациклину, как в случае единичной мутации, так и в совокупности с другими заменами. Например, пять штаммов с сочетанием мутаций Gly120Lys в гене *porB*, Val57Met/Leu в гене *rpsJ* обладали МПК 4 мг/л. Другие варианты замен в кодоне 120 (Gly на Asp, Asn или Thr), а также замены Ala121 на Asp, Asn и Gly оказывали значительное меньшее влияние на рост уровня устойчивости.

В исследуемой выборке также часто выявлялась мутация –35delA в промоторной области гена помпы эффлюкса *mtrR*, в то время как описанные в литературе инсерции тимидина Т или ТТ в положении –10 гена *mtrR* не были обнаружены. Одиночная мутация –35delA, наблюдаемая у пяти изолятов, приводила к появлению умеренной резистентности, в то время как эта замена в совокупности с заменами Val57Met/Leu в гене *rpsJ* и Gly120Lys в гене *porB* приводила к повышению МПК до 2–4 мг/л у 19 штаммов из 23.

Плазмидная детерминанта *tetM*

Плазмиды, несущие гены *tetM*, были обнаружены в 27 штаммах *N. gonorrhoeae*. Наличие гена *tetM* резко повышало МПК тетрациклина до очень высоких величин, в 10 штаммах наблюдали чрезвычайно высокий уровень МПК 32 и 64 мг/л. Таким образом, присутствие *tetM* приводило к значительно более высокой устой-

чивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклину, чем наличие хромосомных детерминант. Штаммы с высоким уровнем резистентности в дополнение к *tetM* гену одновременно имели мутации в генах *rspJ* и *porB* (табл. 1).

Для всех обнаруженных генов *tetM* был определен тип гена: американский или голландский. Поскольку ДНК-чип содержал зонд для детекции *tetM*, общий для обоих типов гена, установление варианта проводили методом секвениро-

вания. Ген американского типа присутствовал в 17 штаммах, голландского — в 10 штаммах, причем наличие и тип плазмиды были ассоциированы с определенным регионом. Так, все 7 плазмидных генов, выделенных из образцов, собранных в Брянске, относились к голландскому типу, в то время как изоляты из Архангельска (4 штамма), Рязани (2 штамма), Калуги (2 штамма), Казани (2 штамма), Чувашии (Чебоксары) (5 штамма) обладали американским типом *tetM*.

Таблица 1. Соответствие между фенотипической чувствительностью штаммов *N. gonorrhoeae* к тетрациклину и генетическими детерминантами резистентности

Table 1. Correlation between phenotypic susceptibility for tetracycline in *N. gonorrhoeae* strains and genetic resistance determinants

Обнаруженные мутации (ген) Detected mutations (gene)	Количество изолятов с МПК, мг/л Number of strains with MIC, mg/L								
	Ч (МПК ≤ 0,25) S (MIC ≤ 0.25)	У/Р (МПК = 0,5–1) I (MIC = 0.5–1)	Р (МПК ≥ 2) R (MIC ≥ 2)						Всего устойчивых Total resistant
			2	4	8	16	32	64	
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>)	3	41	3	–	–	–	–	–	3
Gly120Lys (<i>porB</i>)	1	1	3	1	–	–	–	–	4
Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>)	2	2	1	–	–	–	–	–	1
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Lys (<i>porB</i>)	2	–	1	5	–	–	–	–	6
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>)	2	21	4	–	–	–	–	–	4
–35delA (<i>mtrR</i>)	–	5	–	–	–	–	–	–	–
Gly120Lys (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	–	–	1	–	–	–	–	–	1
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	9	13	6	1	–	–	–	–	7
Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	1	1	–	–	–	–	–	–	–
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Lys (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	1	3	14	5	–	–	–	–	19
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	1	9	2	1	–	–	–	–	3
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene	–	–	–	–	2	5	2	–	9
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>)	–	–	–	–	–	8	3	–	11
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene Gly120Asp (<i>porB</i>)	–	–	–	–	–	–	1	–	1
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Lys/Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>)	–	–	–	–	–	2	2	2	6
Всего Total	22	96							75

Исключение составил Новосибирск, где было обнаружено три гена *tetM* голландского типа и один — американского. Значения МПК тетрациклина не зависели от типа плазмидного гена.

Используя сервис BLAST, выявлен ряд последовательностей у микроорганизмов из родов *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Mycoplasma*, гомологичных генам *tetM N. gonorrhoeae*. Филогенетически близкие последовательности из других микроорганизмов были обнаружены как для генов американского (GenBank Acc. No. L12241, N. g. pOZ100 DNA American), так и голландского (GenBank Acc. No. L12242, N. g. pOZ101 DNA Dutch) аллелей (рис. 3). Полученные нами последовательности *tetM* генов в образцах, собранных в РФ, были депонированы в базу данных Genbank (на рис. 3 присвоенные номера приведены в скобках).

Диагностическая чувствительность и специфичность биологических микрочипов

С использованием результатов, полученных в данной работе, рассчитаны диагностическая чувствительность (S_n) и специфичность (S_p) биологических микрочипов при анализе резистентности клинических изолятов *N. gonorrhoeae* к тетрациклину в сравнении с референсным методом (фенотипическим анализом):

$$S_n = \frac{196}{196 + 22} \times 100\% = 89,9\%;$$

$$S_p = \frac{171}{171 + 10} \times 100\% = 94,5\%.$$

Полученные значения чувствительности и специфичности соответствуют диапазону, характеризующему лучшие зарубежные молекулярные тесты для идентификации генетических детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* [11].

Обсуждение

Исследование выборки из 399 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в различных регионах РФ в 2015–2017 гг., показало, что в настоящее время доля штаммов, демонстрирующих резистентность к тетрациклину, включая штаммы с умеренной резистентностью, составила 45,4%. Как было показано в исследованиях по программе RU-GASP в 2008–2010 гг., доля резистентных к тетрациклину штаммов в РФ в эти годы превышала 75%. Также отмечалось, что уровень нечувствительных к тетрациклину штаммов в отдельных округах РФ варьировал от 64 до 100% [1, 6, 9]. Таким образом, более чем десятилетний отказ от использования тетрациклина для лечения гонококковой инфекции привел к заметному снижению доли резистентных штаммов. Похожая картина, то есть значительное уменьшение доли штаммов, нечувствительных к тетрациклину в 2009–2013 гг., была описана для Беларуси [21], Эстонии [14] и стран Южной Америки [10]. Тем не менее, число изолятов, фенотипически резистентных к тетрациклину и обладающих генетическими маркерами устойчивости, в настоящее время в РФ остается высокой. Принимая во внимание рекомендации ВОЗ, согласно которым антимикробный препарат не рекомендуется к применению, если доля резистентных к нему штаммов возбудителя $\geq 5\%$ [31], не следует ожидать скорого возвращения препаратов тетрациклинового ряда в арсенал средств для лечения гонококковой инфекции.

Причиной данной ситуации является сохранение в геноме возбудителя множественных генетических детерминант резистентности к тетрациклину, в настоящей работе проанализированных с использованием оригинального гидрогелевого биочипа. В исследуемой выборке обнаружены мутации в хромосомных генах

Таблица 2. Генетические детерминанты резистентности к тетрациклину в изолятах *N. gonorrhoeae*, собранных в РФ в 2015–2017 гг.

Table 2. Genetic determinants of tetracycline resistance in *N. gonorrhoeae* strains collected in the Russian Federation in 2015–2017

Ген Gene	Мутация Mutation	Количество изолятов (% от общего числа проанализированных штаммов) Number of isolates (% of total isolates analyzed)
<i>rpsJ</i>	Val57Met	155 (38,8%)
	Val57Leu	9 (2,3%)
	Всего в <i>rpsJ</i> /Total in <i>rpsJ</i>	164 (41,1%)
<i>porB</i>	Gly120Lys	41 (10,3%)
	Gly120Asp/Asn/Thr и/или Ala121Asp/Asn/Gly	51 (12,8%)
	Всего в <i>porB</i> /Total in <i>porB</i>	92 (23,1%)
<i>mtrR</i>	-35delA	73 (18,3%)
	-10insT, -10ins(TT)	0
<i>tetM</i>		27 (6,8%)

rpsJ (модификация мишени), *porB* (нарушение поступления антибиотика) и *mtrR* (усиление эффлюкса), при этом идентифицированы как одиночные замены, так и сочетания мутаций. Замена Val57Met/Leu в гене *rpsJ*, приводила к повышению МПК тетрациклина до умеренных величин. Наиболее важной мутацией в гене *porB* оказалась замена Gly120Lys, которая

оказывала более заметное влияние на резистентность к тетрациклину, чем другие замены в остатках 120–121. В целом, мутации в хромосомных генах приводили к увеличению МПК тетрациклина до 2–4 мг/л, что соответствует литературным данным [28, 30]. Полученные нами результаты подтверждают также известные данные о том, что мутации в пориновом

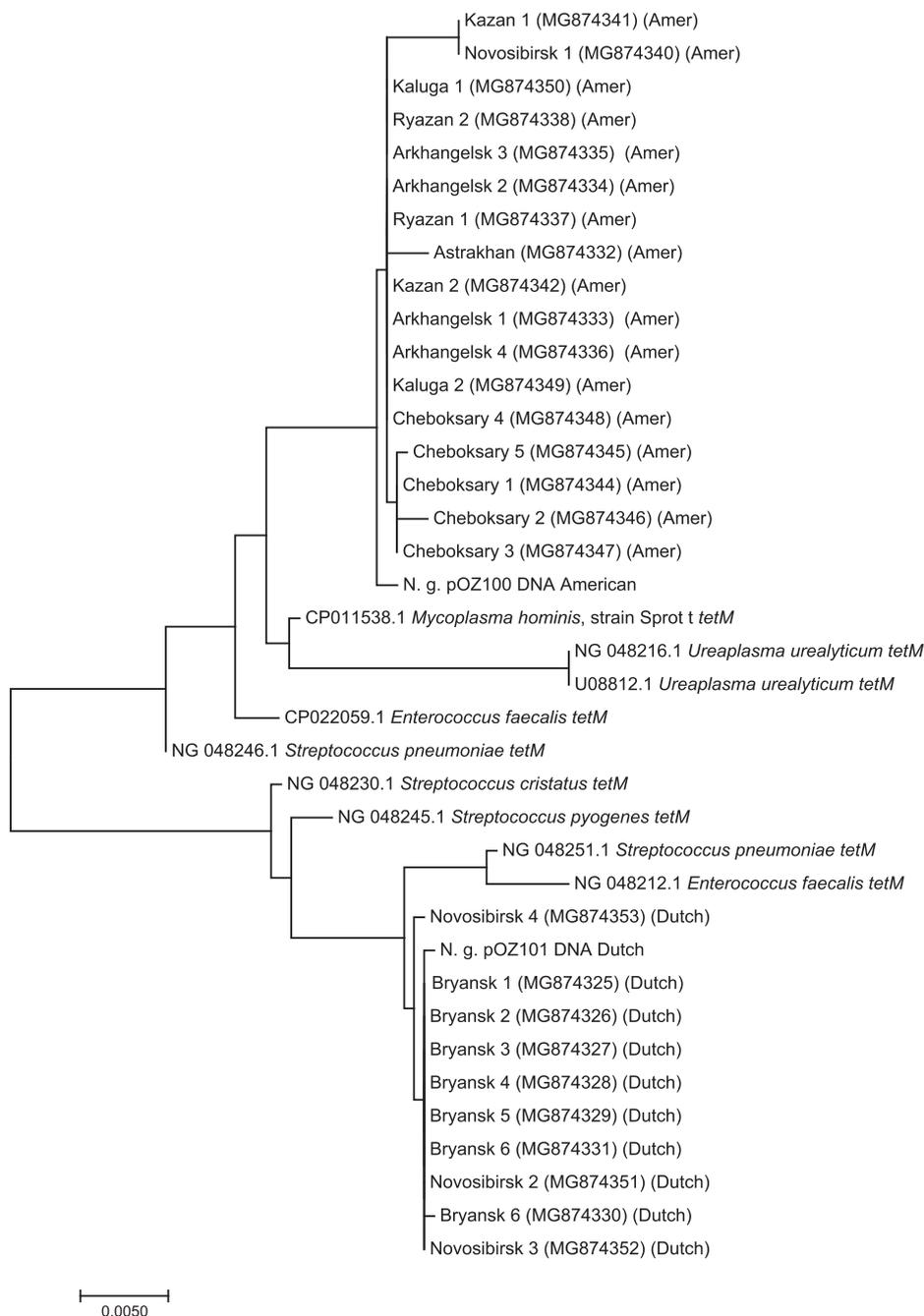


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное по локусам *tetM* из *N. gonorrhoeae* российской популяции и ряда филогенетически близких последовательностей. Для образцов *N. gonorrhoeae*, собранных в РФ, в скобках приведены номера депонированных в GenBank последовательностей и тип плазмидного гена (американский или голландский)

Figure 3. Evolutionary tree constructed for *tetM* loci in *N. gonorrhoeae* samples collected in Russia and a series of phylogenetically close sequences. For the samples collected in the Russian Federation accession numbers of sequences deposited to GenBank and plasmid gene type (American or Dutch) are given in brackets

белке и помпе эффлюкса действуют наиболее эффективно при их сочетании, когда нарушение поступления антимикробного препарата в клетку и одновременно усилен его эффлюкс [17]. Согласно нашим данным, для повышения уровня устойчивости до 4 мг/л необходимо было одновременное присутствие мутаций в генах *porB*, *rspJ* и *mtrR*.

Приобретение *N. gonorrhoeae* плазмидного гена *tetM* приводило к резкому повышению уровня устойчивости к тетрациклинам до величин МПК 8 мг/л и выше, который не достигался при наличии только хромосомных мутаций. Ген *tetM* был обнаружен в 27 штаммах, при этом оказалось, что в российской популяции присутствуют как американский, так и голландский тип гена, что подтверждает построенное филогенетическое дерево. Таким образом, результаты, полученные для изолятов, собранных в России, отличаются от результатов по распределению *tetM* гена в европейских странах, где преобладает американский тип гена [27], а также от результатов, полученных в Польше, в которой, в основном, обнаружен *tetM* ген голландского типа [23]. В то же время

филогенетическая близость нуклеотидных последовательностей *N. gonorrhoeae* внутри каждого из кластеров и отсутствие переходных форм между американскими и голландскими аллелями подтверждает происхождение *tetM* из разных источников.

Таким образом, биочип, представленный в данной работе, является полезным и удобным инструментом для быстрого массового скрининга детерминант резистентности возбудителя гонококковой инфекции, ассоциированных с устойчивостью к антимикробным препаратам. В случае расхождения полученных данных по генетическим маркерам резистентности с результатами культурального определения фенотипической чувствительности, клинические изоляты могут быть подвергнуты полногеномному анализу с использованием технологий секвенирования следующего поколения [15]. Микрочипы и тест-системы на их основе могут найти применение в медицинских учреждениях различного профиля для мониторинга антибиотикорезистентности, предупреждения распространения лекарственно-устойчивых форм и проведения адекватной терапии заболевания.

Список литературы/References

1. Боровская А.Д., Малахова М.В., Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Припутневич Т.В., Аль-Хафаджи Н., Кубанова А.А. Анализ вклада молекулярных механизмов в формирование устойчивости гонококка к тетрациклину // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 144, прил. 2. С. 61–66. [Borovskaya A.D., Malakhova M.V., Vereshchagin V.A., Il'ina E.N., Govorun V.M., Priputnevich T.V., Al-Hafagi N., Kubanova A.A. Analysis of the contribution of molecular mechanisms into formation of gonococcal resistance to tetracycline. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, vol. 144, suppl. 2, pp. 432–437. doi: 10.1007/s10517-007-0347-9 (In Russ.)]
2. Гейдаров Р.Н., Фесенко Е.Е., Шаскольский Б.Л., Клотченко С.А., Васин А.В., Титов С.В., Дементьева Е.И., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Киселев О.И. Определение генетических детерминант устойчивости вируса гриппа А к адамантанам и ингибиторам нейраминидазы на биологическом микрочипе // Доклады Академии наук. 2015. Т. 460, № 1. С. 102–106. [Heydarov R.N., Fesenko E.E., Shaskolskiy B.L., Klotchenko S.A., Vasin A.V., Titov S.V., Dementieva E.I., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M., Kiselev O.I. Identification of genetic determinants of influenza A virus resistance to adamantanes and neuraminidase inhibitors using biological microarray. *Doklady Akademii nauk* = *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2015, vol. 460, no. 1, pp. 4–8. doi: 10.1134/S1607672915010032 (In Russ.)]
3. Грядунов Д.А., Шаскольский Б.Л., Наседкина Т.В., Рубина А.Ю., Заседателев А. С. Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя // Acta Naturae. 2018. Т. 10, № 4 (39). С. 30–44. [Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Yu., Zasedatelev A.S. The EIMB hydrogel microarray technology: thirty years later. *Acta Naturae*, 2018, vol. 10, no. 4 (39), pp. 4–18. (In Russ.)]
4. Кубанов А.А., Лейнсоо А.Т., Честков А.В., Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Соломка В.С., Грядунов Д.А., Дерябин Д.Г. Хромосомные детерминанты резистентности к антибиотикам и фенотипическая чувствительность к антимикробным препаратам *Neisseria gonorrhoeae* в российской популяции // Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 3. С. 431–444. [Kubanov A.A., Leinsoo A.T., Chestkov A.V., Dementieva E.I., Shaskolskiy B.L., Solomka V.S., Gryadunov D.A., Deryabin D.G. Drug resistance mutations and susceptibility phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology*, 2017, vol. 51, no. 3, pp. 379–388. doi: 10.7868/S0026898417030119 (In Russ.)]
5. Лейнсоо А.Т., Шаскольский Б.Л., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А., Кубанов А.А., Честков А.В., Образцова О.А., Шпилевая М.В., Дерябин Д.Г. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта с одновременным анализом детерминант резистентности к антимикробным препаратам // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164, № 7. С. 63–72. [Leinsoo A.T., Shaskol'skii B.L., Dement'eva E.I., Gryadunov D.A., Kubanov A.A., Chestkov A.V., Obratsova O.A., Shpilevaya M.V., Deryabin D.G. Oligonucleotide microchip for the identification of infectious agents of reproductive system with simultaneous analysis of determinants of resistance to antimicrobial substances. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, vol. 164, no. 7, pp. 54–60. doi: 10.1007/s10517-017-3925-5 (In Russ.)]
6. Лесная И.Н., Соломка В.С., Фриго Н.В., Кубанов А.А., Полевщикова С.А., Сидоренко С.В. Выбор препаратов для лечения гонококковой инфекции на основании результатов мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* //

- Вестник дерматологии и венерологии. 2010. Т. 5. С. 65–73. [Lesnaya I.N., Solomka V.S., Frigo N.V., Kubanov A.A., Polevshchikova S.A., Sidorenko S.V. Selection of drugs for treatment of gonococcal infection based on the results of the monitoring of *N. gonorrhoeae* antibiotic resistance. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*, 2010, vol. 5, pp. 65–73. (In Russ.)]
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с. [Susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents: Guidelines 4.2.1890-04. Moscow: Federal Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Russian Ministry of Health, 2004. 91 p. (In Russ.)]
 8. Приложение к приказу Минздрава России № 415 от 20.08.2003 «Протокол ведения больных “Гонококковая инфекция”». [Addendum to the Instruction of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 415 from 20.08.2003 “Patient management protocol, gonococcal infection” (In Russ.)]
 9. Резистентность возбудителей ИППП к антибактериальным препаратам. Информационный бюллетень, 2008 год. М.: ООО «ДЭКС-ПРЕСС», 2008. 40 с. [Resistance of agents causing sexually transmitted infections to antibacterial preparations. Information bulletin, 2008. Moscow: DAKS-PRESS, 2008. 40 p. (In Russ.)]
 10. Dillon J.A., Trecker M.A., Thakur S.D. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. *Sex. Trans. Infect.*, 2013, vol. 89, suppl. 4, iv36–iv41. doi: 10.1136/sextrans-2012-050905
 11. Donà V., Smid J.H., Kasraian S., Egli-Gany D., Dost F., Imeri F., Unemo M., Low N., Endimiani A.J. Mismatch amplification mutation assay-based real-time PCR for rapid detection of *Neisseria gonorrhoeae* and antimicrobial resistance determinants in clinical specimens. *Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 56, no. 9: e00365-18. doi: 10.1128/JCM.00365-18.
 12. Gascoyne D.M., Heritage J., Hawkey P.M., Turner A., van Klingeren B. Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying TetM found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1991, vol. 28, no. 2, pp. 173–183. doi: 10.1093/jac/28.2.173
 13. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, February, 27, 2017. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2017. 7 p.
 14. Golparian D., Brilene T., Laaring Y., Viktorova E., Johansson E., Domeika M., Unemo M. First antimicrobial resistance data and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Estonia, 2009–2013. *New Microbes New Infect.*, 2014, vol. 2, no. 5, pp. 150–153. doi: 10.1002/nmi2.57
 15. Golparian D., Donà V., Sánchez-Busó L., Foerster S., Harris S., Endimiani A., Low N., Unemo M. Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 17596. doi: 10.1038/s41598-018-35750-4
 16. Gryadunov D., Nicot F., Dubois M., Mikhailovich V., Zasedatelev A., Izopet J. Hepatitis C virus genotyping using an oligonucleotide microarray based on the NS5B sequence. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, no. 11, pp. 3910–3917. doi: 10.1128/JCM.01265-10
 17. Hu M., Nandi S., Davies C., Nicholas R.A. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein s10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 10, pp. 4327–4334. doi: 10.1128/AAC.49.10.4327-4334.2005
 18. Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D., Deryabin D. Molecular epidemiology of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Russia (Current Status, 2015). *BMC Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, pp. 389. doi: 10.1186/s12879-016-1688-7
 19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
 20. Lagacé-Wiens P.R.S., Adam H.J., Laing N.M., Baxter M.R., Martin I., Mulvey M.R., Karlowsky J.A., Hoban D.J., Zhanel G.G. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to alternative antimicrobials with therapeutic potential. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017, vol. 72, no. 8, pp. 2273–2277. doi: 10.1093/jac/dkx147
 21. Lebedzeu F., Golparian D., Titov L., Pankratava N., Glazkova S., Shimanskaya I., Charniakova N., Lukyanau A., Domeika M., Unemo M. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010–2013. *BMC Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 1, p. 29. doi: 10.1186/s12879-015-0755-9
 22. Marzancola M.G., Sedighi A., Li P.C. DNA microarray-based diagnostics. *Methods Mol. Biol.*, 2016, vol. 1368, pp. 161–178. doi: 10.1007/978-1-4939-3136-1_12
 23. Młynarczyk-Bonikowska B., Kujawa M., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S. Plasmid-mediated resistance to tetracyclines among *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland between 2012 and 2013. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2016, vol. 33, no. 6, pp. 475–479. doi: 10.5114/ada.2016.63887
 24. Morse S.A., Johnson S.R., Biddle J.W., Roberts M.C. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, vol. 30, no. 5, pp. 664–670.
 25. Nguyen F., Starosta A.L., Arenz S., Sohmen D., Dönhöfer A., Wilson D.N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.*, 2014, vol. 395, no. 5, pp. 559–575. doi: 10.1515/hsz-2013-0292
 26. Nosova E., Zimenkov D., Khakhalina A., Krylova L., Makarova M., Galkina K., Krasnova M., Isakova A., Safonova S., Litvinov V., Gryadunov D., Bogorodskaya E. A comparison of the Sensititre MycoTB Plate, the Bactec MGIT 960, and a microarray-based molecular assay for the detection of drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Moscow, Russia. *PLoS One*, 2016, vol. 11: e0167093. doi: 10.1371/journal.pone.0167093
 27. Pachulec E., van der Does C. Conjugative plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 4: e9962. doi: 10.1371/journal.pone.0009962
 28. Suay-García B., Pérez-García M.T. Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: latest developments. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2017, vol. 36, no. 7, pp. 1065–1071. doi: 10.1007/s10096-017-2931-x
 29. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, vol. 10, no. 3, pp. 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

30. Unemo M., Shafer W.M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, vol. 27, no. 3, pp. 587–613. doi: 10.1128/CMR.00010-14
31. WHO. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO Press, 2012. 40 p.
32. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Krasnova M.A., Chernyaeva E.N., Zhuravlev V.Y., Kuz'min A.V., Popov S.A., Zasedatelev A.S., Gryadunov D.A. Evaluation of a low-density hydrogel microarray technique for Mycobacterial species identification. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 4, pp. 1103–1114. doi: 10.1128/JCM.02579-14
33. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y., Gryadunov D.A. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2016, vol. 71, no. 6, pp. 1520–1531. doi: 10.1093/jac/dkw015

Авторы:

Дементьева Е.И., к.х.н., научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Шаскольский Б.Л., к.х.н., научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Лейнсоо А.Т., младший научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Грядун Д.А., к.б.н., зав. лабораторией технологий молекулярной диагностики, зам. директора по научной работе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Петрова Н.П., младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия;

Честков А.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия;

Кубанов А.А., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия;

Дерябин Д.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Dementieva E.I., PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences (RAS), Moscow, Russian Federation;

Shaskolskiy B.L., PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russian Federation;

Leinsoo A.T., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russian Federation;

Gryadunov D.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Deputy Director for Science of the Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russian Federation;

Petrova N.P., Junior Researcher, Department of Laboratory Diagnostics of STD and Dermatoses, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation;

Chestkov A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Laboratory Diagnostics of STD and Dermatoses, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation;

Kubanov A.A., RAS Corresponding Member, PhD (Medicine), Professor, Chief Researcher, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation;

Deryabin D.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Laboratory Diagnostics of STD and Dermatoses, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.03.2018
Отправлена на доработку 04.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 26.03.2018
Revision received 04.03.2019
Accepted 22.03.2019

РЕАКЦИЯ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ В СРАВНЕНИИ С РЕАКЦИЕЙ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ ОЦЕНКЕ ИММУНОГЕННОСТИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН И ДИАГНОСТИКЕ ГРИППА

В.З. Кривицкая¹, Е.В. Кузнецова¹, В.Г. Майорова¹, Р.А. Кадырова¹, Н.И. Львов²,
А.А. Го³, А.А. Соминина¹

¹ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования являлось сравнение результатов реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции микронейтрализации при детекции антител к вирусам гриппа А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) в сыворотках людей, а также оптимизация условий постановки реакции микронейтрализации. Предложенный вариант реакции микронейтрализации основан на выявлении снижения репродукции вируса гриппа в инфицированных клетках MDCK в присутствии вирусспецифичных сывороточных антител. Репродукцию вирусов в клетках оценивали иммуноферментным методом в 96-луночных культуральных планшетах с помощью типоспецифичных моноклональных антител, направленных к NP-белку вирусов гриппа А. Параллельно в реакции микронейтрализации и РТГА были проанализированы парные сыворотки 205 волонтеров, привитых инактивированными сезонными гриппозными вакцинами, а также 117 взрослых пациентов, переболевших лабораторно подтвержденным гриппом. Доказана целесообразность обработки сывороток человека рецептор-разрушающим энзимом (RDE) при постановке не только РТГА, но и реакции микронейтрализации. Показана большая чувствительность реакции микронейтрализации по сравнению с РТГА. По данным микронейтрализации показатели частоты сероконверсий и кратности прироста антител к вирусам гриппа А у вакцинированных и переболевших людей превышали в 1,4–2,5 раза результаты, полученные в РТГА. Более высокая чувствительность реакции микронейтрализации имела большое значение при расшифровке заболевания, вызванного новым патогеном. Эффективность серодиагностики гриппа А(Н1N1)pdm09 у ПЦР-положительных пациентов была в 1,5 раза выше по результатам реакции микронейтрализации по сравнению с РТГА. Согласно традиционным представлениям, основанным на результатах ранних работ, титр гриппспецифичных антител 1/40, выявленный в РТГА, считается защитным. При этом общепринятого протективного уровня вирусспецифичных антител для реакции нейтрализации до сих пор не установлено. Уровни антител в сыворотках, выявленные при использовании предложенного варианта реакции микронейтрализации, были значительно выше, чем по результатам РТГА. В поствакцинальных сыворотках привитых волонтеров среднегрупповые титры вируснейтрализующих антител, соответствующие 1/40 в РТГА, составили

Адрес для переписки:

Кривицкая Вера Зорьевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (812) 499-15-29 (служебн.); 8 921 886-37-95 (моб.).
E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Contacts:

Vera Z. Krivitskaya
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str.,
15/17, Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone/fax: +7 (812) 499-15-29 (office); +7 921 886-37-95 (mobile).
E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Библиографическое описание:

Кривицкая В.З., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г., Кадырова Р.А.,
Львов Н.И., Го А.А., Соминина А.А. Реакция микронейтрализации
в сравнении с реакцией торможения гемагглютинации при оценке
иммуногенности гриппозных вакцин и диагностике гриппа // Инфекция
и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 763–772. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-5-6-763-772

Citation:

Krivitskaya V.Z., Kuznecova E.V., Majorova V.G., Kadyrova R.A.,
Lvov N.I., Go A.A., Somina A.A. Microneutralization reaction compared
to hemagglutination inhibition assay to evaluate immunogenicity of influenza
vaccines and influenza diagnostics // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 763–772.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-763-772

1/195, 1/203 и 1/426–1/430 для вирусов гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) соответственно. В сыворотках переболевших гриппом пациентов эти же показатели составили 1/285, 1/215 и 1/488. В соответствии с этим для реакции микронейтрализации порогами для «условно протективного» уровня антител у взрослых вакцинированных волонтеров или заболевших пациентов предложено считать в титры 1/160 для вирусов А(H1N1) и А(H1N1)pdm09, а также 1/320 для вируса А(H3N2), что согласуется с данными других исследователей.

Ключевые слова: реакция микронейтрализации, реакция торможения гемагглютинации, гриппозные вакцины, взрослые пациенты, грипп А(H1N1), грипп А(H3N2).

MICRONEUTRALIZATION REACTION COMPARED TO HEMAGGLUTINATION INHIBITION ASSAY TO EVALUATE IMMUNOGENICITY OF INFLUENZA VACCINES AND INFLUENZA DIAGNOSTICS

Krivitskaya V.Z.^a, Kuznecova E.V.^a, Majorova V.G.^a, Kadyrova R.A.^a, Lvov N.I.^b, Go A.A.^c, Sominina A.A.^a

^a Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defence of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The aim of this study was to compare the results of the hemagglutination inhibition test (HI-test) and micro-neutralization reaction in detection of antibodies to influenza A(H1N1), A(H1N1)pdm09, and A(H3N2) viruses in human sera, as well optimize microneutralization reaction conditions. The proposed variant of microneutralization reaction is based on detecting decreased influenza virus reproduction in infected MDCK cells in the presence of virus-specific serum antibodies. Virus reproduction was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay in 96-well cell culture plates using type-specific anti-influenza A virus NP-protein monoclonal antibodies. In parallel, in microneutralization reaction and HI-test paired sera collected from 205 volunteers inoculated with inactivated seasonal influenza vaccines were analyzed, as well as from 117 adult patients with laboratory-confirmed influenza. The rationale for treatment of human serum with receptor-destroying enzyme (RDE) was proved not only for HI-test, but also for microneutralization reaction. Compared to HI-assay, the microneutralization reaction displayed higher sensitivity. According to microneutralization data, seroconversion rates and increase in antibody titer against influenza A viruses in both vaccinated and infected persons were superior to HI-test data by 1.4–2.5-fold. Moreover, higher sensitivity of this method was of great importance for the diagnostics of disease caused by new pathogens. The efficacy of influenza A(H1N1)pdm09 serodiagnostics in PCR-positive patients was 1.5 times higher based on microneutralization reaction vs. HI-assay data. According to the data from early studies, it is commonly believed that 1/40 titer of flu-specific antibodies detected by HI-test is set as protective. However, a consensus on protective level for virus-specific antibodies in neutralization reaction has not been established yet. It was found that serum antibody levels detected by the proposed version of microneutralization reaction were significantly higher than those in HI-assay. In the post vaccination sera collected from vaccinated volunteers, average titers of virus neutralizing antibodies corresponding to 1/40 in HI-test were 1/195, 1/203, and 1/426–1/430 for influenza A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2), respectively, whereas in influenza patients they were 1/285, 1/215 and 1/488, respectively. Thus, it was suggested to consider a threshold value for “conditionally protective” level of neutralizing antibodies in adult vaccinated volunteers or infected patients, an average titer 1/160 for A(H1N1) and A(H1N1)pdm09 viruses, as well as 1/320 — for A(H3N2) virus, which agree with data published elsewhere.

Key words: microneutralization reaction, hemagglutination inhibition assay, influenza vaccines, adult patients, influenza A(H1N1), influenza A(H3N2).

В исследованиях, связанных с гриппом, серологические методы используют для оценки иммуногенности вакцин, уровня популяционного иммунитета, а также диагностики заболевания. Наиболее широко применяемым тестом для выявления противогриппозных антител (АТ) является реакция торможения гемагглютинации (РТГА), поскольку этот метод специфичен и прост в исполнении. Помимо этого, еще в ранних работах была установлена корреляция между титрами АТ в РТГА и уровнем защиты от заболевания гриппом [10, 15], что до сих пор используется при оценке иммуногенности гриппозных вакцин. Однако традиционная постановка РТГА имеет ряд ограничений. Прежде всего, чувствительность реакции во многом за-

висит от видовой принадлежности и качества эритроцитов [20]. Наиболее существенным недостатком является низкая чувствительность при детекции АТ, взаимодействующих с гемагглютинином (ГА) вирусов птичьего происхождения, включая пандемические вирусы А(Н5) и А(Н7) [16, 20, 24].

При оценке АТ, направленных к вирусам гриппа, для ИФА показана высокая чувствительность [3]. Однако наличие консервативных эпитопов в молекуле ГА, общих для многих субтипов вируса гриппа А, обуславливает невозможность использовать данный метод для выявления субтипоспецифичных АТ даже в случае использования в качестве антигена высокоочищенного ГА [16]. Помимо этого, не показано

корреляции между уровнем АТ, определяемых в ИФА, титрами АТ в РТГА и протективной активностью АТ [21].

В качестве альтернативного метода при выявлении АТ к вирусам гриппа птиц в сыворотках людей и оценке иммуногенности вакцин против птичьего гриппа успешно используют реакцию микронейтрализации (МН) [7, 17]. Метод основан на выявлении с помощью моноклональных АТ (МКА), специфичных к NP-белку вируса гриппа, уровня снижения репродукции вируса в инфицированной культуре клеток MDCK в присутствии противогриппозных АТ.

В настоящее время реакция МН все шире внедряется в лабораторную практику. Так, в 2014 г. Комитет Европейского медицинского агентства по лекарственным средствам для человека (European Medicines Agency) рекомендовал применять этот тест наряду с РТГА для оценки иммуногенности всех гриппозных вакцин [8]. Метод субтипоспецифичен и, в отличие от РТГА, которая выявляет лишь АТ, направленные к рецепторному карману молекулы ГА, позволяет оценивать уровень АТ, реагирующих со всеми нейтрализующими эпитопами как в составе ГА, так и нейраминидазы вирусов гриппа. Таким образом, реакция МН отражает противовирусные свойства АТ значительно шире, чем РТГА. В многочисленных исследованиях показано, что реакция МН является более чувствительным методом по сравнению с РТГА при детекции АТ, направленных к вирусам гриппа человека и животных [9, 16, 19, 23].

Однако в то время как протокол проведения и оценки полученных результатов РТГА регламентирован [1, 2, 8], единые международные стандарты для реакции МН до сих пор отсутствуют. Этим объясняются значительные межлабораторные расхождения при выявлении нейтрализующих АТ в одних и тех же образцах [20].

Целью настоящего исследования являлось сравнение результатов РТГА и реакции МН при детекции АТ к вирусам гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) в сыворотках вакцинированных и переболевших гриппом людей, а также оптимизация условий постановки реакции МН.

Материалы и методы

Клинические материалы. В реакции МН и РТГА параллельно были проанализированы:

- пре- и поствакцинальные сыворотки 55 взрослых волонтеров, однократно привитых в 2008 г. трехвалентной инактивированной сезонной гриппозной вакциной «А»;
- пре- и поствакцинальные сыворотки 150 взрослых волонтеров, однократно привитых в 2016 г. четырехвалентной инактивированной гриппозной вакциной «Б»;

– парные сыворотки 117 взрослых пациентов, полученные в острой (2–4 день) и реконвалесцентной (7–15 день) стадиях заболевания.

Больные были госпитализированы в клинику г. Санкт-Петербурга. В первую группу вошли переболевшие гриппом А(Н1N1) в 1999–2008 гг. (21 человек). Вторая группа включала 28 пациентов, болевших гриппом А(Н1N1)pdm09 с ноября 2009 по 2010 гг. 68 человек, перенесших грипп А(Н3N2) в сезон 2014–2015 гг., составили третью группу. Диагноз гриппа А, а также субтип вируса, вызвавшего заболевание, были установлены на основании данных ПЦР при анализе назальных мазков с использованием наборов «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A type FL» и «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» (Интерлабсервис, Москва) и/или по выявлению прироста субтипоспецифичных IgG в парных сыворотках при использовании ИФА-тест-систем (ООО «ППДП», Санкт-Петербург).

Вирусные штаммы. В РТГА и реакции МН были использованы вирусы A/New Caledonia/20/99 (H1N1); A/Brisbane/59/07 (H1N1); A/California/07/09 (H1N1)pdm09; A/Brisbane/10/07 (H3N2); A/Texas/50/12 (H3N2); A/Switzerland/9715293/13 (H3N2); A/Hong Kong/4801/14 (H3N2), полученные из музейной коллекции вирусов гриппа и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смординцева.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) была проведена в соответствии с Методическими указаниями МУ 3.3.2.1758-03 2003 [2] с использованием гриппозных диагностикумов (ООО «ППДП», Санкт-Петербург). Сыворотки крови (в разведении 1/10) предварительно обрабатывали рецептор-разрушающим энзимом (Receptor Destroying Enzyme, RDE) производства «Denka Seiken Co., LTD» (Япония) с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 мин. При постановке реакции использовали 0,5% куриные эритроциты.

Определение титров АТ в реакции микронейтрализации (МН). Клеточную культуру MDCK, полученную из коллекции «Influenza Reagent Resource» (IRR, США), выращивали в течение 24 ч в 96-луночных планшетах Nunclon (Thermo Fisher Scientific, Дания) при 37°C в CO₂-термостате в среде Игла-МЭМ (ООО «БиолоГ», Санкт-Петербург) до плотности 80–90%. Для анализа сыворотки крови прогревали при 56°C в течение 30 мин после (или без) обработки RDE (Denka Seiken Co., LTD, Япония). Двукратные разведения анализируемых сывороток соединяли с равными объемами (по 50 мкл) вирусов гриппа, содержащих 100 ТЦД₅₀. Для разведения вирусов и сывороток использовали среду Игла-МЭМ (ООО «БиолоГ», Санкт-Петербург) с добавлением 0,126 мг/мл аргинина и 2 мг/мл ТРСК-трипсина

(Sigma, США). Смеси инкубировали 2 ч при 37°C в CO₂-термостате. После этого 100 мкл смеси «вирус+сыворотка» вносили в лунки с клетками MDCK, двукратно отмытые средой Игла-МЕМ (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). Рабочую дозу вируса контролировали заражением клеток его 10-кратными разведениями. Планшеты выдерживали 72 ч в CO₂-термостате. После удаления среды клетки фиксировали (200 мкл/лунку) 80% холодным ацетоном (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург) в течение 20 мин. После отмывания планшетов ингибирование репродукции вируса в присутствии АТ учитывали в микрокультуральном ИФА с использованием пероксидазного конъюгата МКА 6D11 (6D11-Пх), взаимодействующих с NP-белком вирусов гриппа А различных субтипов. Все МКА и МКА-Пх получены в ФГБУ НИИ гриппа. В лунки вносили по 100 мкл 6D11-Пх, разведенного 1/5000 5% обезжиренным молоком (ЗАО «СИ-Проджект», Санкт-Петербург) на 0,01М фосфатно-солевом буфере (ФСБ-М), рН 7,4. После часовой инкубации планшетов при 37°C и отмывки ФСБ (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) в лунки добавляли 100 мкл субстрат-хромогенной смеси, содержащей 0,05% H₂O₂ (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург) и 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma, США) в 0,1М ацетат-цитратном буфере (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург), рН 5,0. Через 20 мин реакцию останавливали (50 мкл/лунку) 2N H₂SO₄ (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург). Оптическую плотность при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) определяли на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия). Конечным нейтрализующим титром АТ считали последнее разведение сыворотки, при котором наблюдалось не менее чем двукратное снижение OD₄₅₀ по сравнению с контролем репродукции вируса (100 ТЦД₅₀ вируса в отсутствие сыворотки).

Приготовление конъюгатов МКА с пероксидазой хрена (МКА-Пх) осуществляли периодатным методом [14].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерной программы «StatstDirect». Мерой взаимосвязи между двумя переменными служил коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Для сравнения двух выборок по частоте выявления признаков использовали точный критерий Фишера. Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Одна из задач проведенного исследования состояла в оптимизации условий проведения реакции МН, включая необходимость обработки сывороток RDE для устранения неспецифи-

ческих реакций, обусловленных содержанием в крови ингибиторов, чувствительных к нейраминидазе.

Были проанализированы пре- и поствакцинальные сыворотки 55 взрослых волонтеров, однократно привитых в 2008 г. трехвалентной инактивированной сезонной гриппозной вакциной «А». Методом сравнения служила РТГА, для которой все проанализированные сыворотки были подвергнуты термической обработке (56°C в течение 30 мин) после воздействия RDE. Реакцию МН проводили в двух вариантах: пробы были прогреты при 56°C после или без обработки RDE.

Оценка гуморального иммунного ответа по отношению к вирусам гриппа А(H1N1) и А(H3N2) выявила, что такие показатели иммуногенности вакцин, как частота сероконверсий и кратность прироста АТ, не отличались по результатам РТГА и реакции МН, проведенной с пробами, не обработанными RDE. Введение RDE привело к снижению титров нейтрализующих АТ. При этом СГТ в сыворотках до вакцинации снижались в 2,4 раза, а после вакцинации — в значительно меньшей степени (только в 1,2–1,5 раза) по сравнению с показателями нейтрализующей активности, полученными без использования RDE. С другой стороны, после такой обработки в реакции МН наблюдалось увеличение показателей частоты сероконверсий и кратности прироста АТ, особенно (в 1,7–2 раза) при детекции АТ к вирусу гриппа А(H3N2), по сравнению как с РТГА, так и с реакцией МН без использования RDE (табл. 1).

Эти результаты свидетельствуют о целесообразности обработки сывороток человека RDE при постановке не только РТГА, но и реакции МН. В этой связи все последующие опыты при анализе иммуногенности вакцины «Б» и иммунного ответа у больных были проведены с применением RDE в обоих тестах.

При таких условиях титры АТ, выявленные в реакции МН, коррелировали с титрами в РТГА для всех анализированных вирусов гриппа А. Коэффициенты корреляции (r) для титров АТ в сыворотках, полученных после вакцинации или в реконвалесцентной фазе заболевания гриппом, составляли 0,60–0,85 ($p < 0,001$).

По результатам оценки эффективности инактивированной вакцины «Б» частота сероконверсий в ответ на иммунизацию была одинакова по данным обоих тестов. Однако для вирусов гриппа А обоих субтипов, СГТ АТ, оцененные в реакции МН, были значительно выше по сравнению с показателями РТГА в сыворотках, полученных как до, так и после вакцинации: в 1,8–2,2 раза для вируса А(H1N1)pdm09

и 3,8–4,3 раза для А(Н3N2). Кратность прироста АТ также была выше в 1,4–1,6 раза в реакции МН по сравнению с РТГА (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о большей чувствительности реакции МН по сравнению с РТГА. Это особенно четко проявлялось при оценке гуморального иммунного

ответа у больных с лабораторно подтвержденным гриппом. Частота сероконверсий нейтрализующих АТ ко всем трем вирусам — А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) — была выше на 18–29%, чем соответствующие показатели РТГА. СГТ АТ к вирусам гриппа в сыворотках реконвалесцентов и кратность прироста АТ также

Таблица 1. Характеристика иммуногенности вакцины «А» по отношению к вирусам гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) (по результатам РТГА и реакции МН)

Table 1. Immunogenicity of vaccine “A” against influenza A(H1N1) and A(H3N2) viruses (results of hemagglutination inhibition test and microneutralization reaction)

Параметры Characteristics	А(Н1N1)			А(Н3N2)		
	РТГА (с RDE) HI-test (with RDE)	Реакция МН Microneutralization reaction		РТГА (с RDE) HI-test (with RDE)	Реакция МН Microneutralization reaction	
		без RDE without RDE	с RDE with RDE		без RDE without RDE	с RDE with RDE
Частота сероконверсий (%) Seroconversion rates (%)	72,7	72,7	80,0	50,9	50,9	69,1
Среднеарифметические титры антител в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Arithmetic mean antibody titers in sera before/after vaccination (reciprocal values)	55,0/252,7	219,9/938,2	102,0/739,9	53,4/154,7	302,9/950,5	220,5/898,2
Среднегеометрические титры антител (СГТ) в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Geometric mean antibody titers (GMT) in sera before/after vaccination (reciprocal values)	19,3/148,3	89,6/585,9	36,3/372,2	25,4/95,4	160,0/557,1	65,4/438,5
Кратность прироста антител между сыворотками до и после вакцинации Increase in antibody titers among pre and post vaccination sera	7,7	7,0	10,2	3,8	3,5	6,7
Условно защитные титры антител (обратные величины) в поствакцинальных сыворотках* Conditionally protective antibody titers (reciprocal values) in post vaccination sera*	40	262	203	40	464	430
Частота выявления условно защитных титров антител после вакцинации (%)** Frequency of conditionally protective antibody titers detected after vaccination (%)**	89,1	94,5	81,8	90,9***	81,8	72,7***
Число обследованных волонтеров The number of volunteers	55			55		

Примечания. Вирусы, использованные для РТГА и реакции МН: А/Brisbane/59/07 (H1N1); А/Brisbane/10/07 (H3N2). *Условно защитными титрами антител в реакции МН считали титры АТ, соответствующие 1/40 в РТГА. **При подсчетах защитными титрами АТ в реакции МН считали титры не ниже 1/160 и 1/320 для вирусов А(Н1N1) и А(Н3N2). Для РТГА $\geq 1/40$ для обоих вирусов. *** $p = 0,02$.

Notes. Viruses used for hemagglutination inhibition test (HI-test) and microneutralization reaction: A/Brisbane/59/07 (H1N1); A/Brisbane/10/07 (H3N2). *Conditionally protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers corresponding to 1/40 in HI-test. **Protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers not lower than 1/160 and 1/320 for A(H1N1) and A(H3N2) viruses. In HI-test – $\geq 1/40$ for both viruses. *** $p = 0,02$.

превышали в реакции МН эти же показатели РТГА в 1,9–9,5 и 1,8–2,5 раза соответственно (табл. 3).

По традиционным представлениям, основанным на результатах ранних работ [10, 15], титр грипп-специфичных АТ 1/40, выявленный в РТГА, считается защитным. При этом общепринятого протективного уровня вирусспецифичных АТ для реакции нейтрализации до сих пор не существует.

В задачу настоящего исследования входило определение «условно защитных» титров нейтрализующих АТ, специфичных к вирусам гриппа А различных субтипов, соответствующих титру 1/40 в РТГА.

Как было показано выше, титры АТ в сыворотках, выявленные в реакции МН, были значительно выше, чем в тех же пробах по резуль-

татам РТГА. В поствакцинальных сыворотках привитых волонтеров среднегрупповые титры вируснейтрализующих АТ, соответствующие 1/40 в РТГА, составили 1/195, 1/203 и 1/426–1/430 для вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) соответственно (табл. 1 и 2). В сыворотках переболевших гриппом пациентов эти же показатели составили 1/285, 1/215 и 1/488 (табл. 3).

В соответствии с этим для предложенной постановки реакции МН порогами для «условно протективных» титров АТ у взрослых вакцинированных волонтеров или заболевших пациентов были приняты в среднем титры 1/160 для вирусов А(Н1N1) и А(Н1N1)pdm09, а также 1/320 для вируса А(Н3N2).

Следует отметить, что при условии принятия данных порогов частота выявления условно за-

Таблица 2. Характеристика иммуногенности вакцины «Б» по отношению к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) (по результатам РТГА и реакции микронейтрализации)

Table 2. Immunogenicity of vaccine "B" against influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses (results of HI-test and the microneutralization reaction)

Параметры Characteristic	А(Н1N1)pdm09		А(Н3N2)	
	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction
Частота сероконверсий (%) Seroconversion rates (%)	56,0	56,0	62,7	63,3
Среднеарифметические титры антител в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Arithmetic mean antibody titers in sera before/after vaccination (reciprocal values)	54,2/141,4	114,7/359,9	22,5/90,3	110,7/415,5
Среднегеометрические титры антител (СГТ) в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Geometric mean antibody titers (GMT) in sera before/after vaccination (reciprocal values)	25,4/101,7	44,7/218,1	11,9/53,0	42,7/233,7
Кратность прироста антител между сыворотками до и после вакцинации Increase in antibody titers among pre and post vaccination sera	9,4	12,7	10,1	15,5
Условно защитные титры антител (обратные величины) в поствакцинальных сыворотках* Conditionally protective antibody titers (reciprocal values) in post vaccination sera*	40	195	40	426
Частота выявления условно защитных титров антител после вакцинации (%)** Frequency of conditionally protective antibody titers detected after vaccination (%)**	96,0#	74,0#	78,0##	58,0###
Число обследованных волонтеров The number of volunteers	150		150	

Примечания. Вирусы, использованные для РТГА и реакции МН: А/California/07/09 (Н1N1)pdm09, А/Hong Kong/4801/14 (Н3N2).

*Условно защитными титрами антител в реакции МН считали титры АТ, соответствующие 1/40 в РТГА. **При подсчетах защитными титрами АТ в реакции МН считали 1/160 для вирусов А(Н1N1)pdm09 и 1/320 для вируса А(Н3N2). Для РТГА — $\geq 1/40$ для обоих вирусов. #p < 0,0001, ##p = 0,0003.

Notes. Viruses used for hemagglutination inhibition test and microneutralization reaction: A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/4801/14 (H3N2). *Conditionally protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers corresponding to 1/40 in HI-test. **Protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers not lower than 1/160 and 1/320 for A(H1N1) pdm09 and A(H3N2) viruses. In HI-test — $\geq 1/40$ for both viruses. #p < 0,0001, ##p = 0,0003.

Таблица 3. Гуморальный иммунный ответ на инфицирование вирусами гриппа А у взрослых пациентов (по результатам РТГА и реакции микронейтрализации)

Table 3. Humoral immune response to influenza A virus infection in adult patients (results of HI-test and the microneutralization reaction)

Параметры Characteristic	Вирус — возбудитель заболевания Causative agent of viral diseases					
	А(Н1N1)		А(Н1N1)pdm09		А(Н3N2)	
	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction
Частота сероконверсий (%) Seroconversion rates (%)	66,7 [#]	95,2 [#]	60,7 ^{##}	89,3 ^{##}	66,2 ^{###}	89,7 ^{###}
Среднеарифметические титры антител в сыворотках, полученных в острой/реконвалесцентной фазах заболевания (обратные величины) Arithmetic mean antibody titers in sera obtained in acute/convalescent phases of the disease (reciprocal values)	27,4/ 187,6	187,9/1310,5	37,8/ 107,3	86,9/229,6	36,8/ 182,6	132,9/954,4
Среднегеометрические титры антител (СГТ) в сыворотках, полученных в острой/реконвалесцентной фазах заболевания (обратные величины) Geometric mean antibody titers (GMT) in sera obtained in acute/convalescent phases of the disease (reciprocal values)	20,0/ 100,8	91,3/951,0	16,4/ 59,4	20,5 /113,2	24,3/ 101,1	37,6/292,0
Кратность прироста антител в парных сыворотках Increase in antibody titers in paired sera	10,0	18,6	5,6	11,6	7,9	20,1
Условно защитные титры антител (обратные величины) в сыворотках реконвалесцентов* Conditionally protective antibody titers (reciprocal values) in sera of convalescent patients*	40	285	40	215	40	488
Частота выявления условно защитных титров антител в сыворотках реконвалесцентов (%)** Frequency of conditionally protective antibody titers in sera of convalescent patients (%)**	85,7	90,4	75,0	53,6	88,2 ^{***}	54,4 ^{***}
Число обследованных пациентов The number of patients	21		28		68	
Время проведения обследования Time of the study	1999–2008		2009–2010		2014–2015	

Примечания. Вирусы, использованные для РТГА и реакции МН: А/New Caledonia/20/99 (H1N1); А/California/07/09 (H1N1)pdm; А/Texas/50/12 (H3N2); А/Switzerland/9715293/13 (H3N2). *Условно защитными титрами антител в реакции МН считали титры, соответствующие 1/40 в РТГА. **При подсчетах защитными титрами АТ в реакции МН считали 1/160 для вирусов А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и 1/320 для вирусов А(Н3N2). Для РТГА — $\geq 1/40$ для всех вирусов. [#]p = 0,018, ^{##}p = 0,03, ^{###}p = 0,0013, ^{***}p < 0,0001.

Notes. Viruses used for hemagglutination inhibition test and microneutralization reaction: A/New Caledonia/20/99 (H1N1); A/California/07/09 (H1N1)pdm; A/Texas/50/12; A/Switzerland/9715293/13 (H3N2). *Conditionally protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers corresponding to 1/40 in HI-test. **Protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers not lower than 1/160 and 1/320 for A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses. In HI-test — $\geq 1/40$ for both viruses. [#]p = 0,018, ^{*}p = 0,03, ^{###}p = 0,0013, ^{***}p < 0,0001.

щитных титров АТ к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) была значимо ниже в реакции МН, чем РТГА, как у волонтеров после вакцинации, так и у переболевших пациентов (табл. 1, 2, 3).

Обсуждение

Одной из причин искажения результатов серологических реакций может быть неспецифическое взаимодействие вирусных поверхностных гликопротеинов с целым рядом молекул, содержащихся в сыворотках животных и человека. Такие ингибиторы, являющиеся компонентом врожденного иммунитета, блокируют рецептор-связывающие сайты ГА, конкурируя с АТ за связь с вирусом гриппа [12]. В стандартную процедуру подготовки сывороток к постановке РТГА, помимо термического воздействия при 56°C в течение 30 мин для устранения термолabile ингибиторов, входит также обработка RDE [2, 18] для разрушения термостабильных компонентов, содержащих сиаловые кислоты и мимикрирующих под структуру клеточных рецепторов для вирусов.

Общепринятым для реакции МН является прогревание сывороток при 56°C, но нет единого мнения о необходимости использования RDE. Например, в руководстве ВОЗ предписывается обрабатывать RDE только сыворотки животных [18]. Протоколы проведения реакции МН, предлагаемые другими авторами, рекомендуют такую обработку также для сывороток человека, что увеличивает чувствительность метода [11].

При отработке условий постановки реакции МН мы опирались на существующие руководства и исследования [11, 18], а также на собственный многолетний опыт по сравнению различных диагностических тестов.

Оценка гуморального иммунного ответа по отношению к вирусам гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) показала, что введение RDE при постановке реакции МН приводило к снижению титров нейтрализующих АТ. При этом СГТ в сыворотках до вакцинации снижались в 2,4 раза, а после вакцинации — в значительно меньшей степени (только в 1,2–1,5 раза) по сравнению с показателями нейтрализующей активности, полученными без использования RDE.

Такие различия могут указывать на то, что в крови здоровых взрослых людей (в пробах до вакцинации) содержание неспецифических ингибиторов, являющихся частью врожденного иммунитета, выше, чем в поствакцинальных сыворотках, поскольку у привитых лиц превалирует вирусспецифичный адаптивный иммунный ответ. Именно за счет большего снижения уровня противогриппозных АТ в пробах, взятых до вакцинации, можно объяснить повышение чувствительности теста МН, в том чис-

ле по сравнению с РТГА, поскольку обработка сывороток RDE позволяет более четко выявлять сероконверсии к вирусам гриппа А в парных сыворотках вакцинированных волонтеров и больных людей.

Более высокая чувствительность реакции МН по сравнению с РТГА имело особенно большое значение для детекции АТ к вирусу А(Н1N1)pdm09. На момент проведения анализа в 2009 г. этот новый патоген только начинал циркулировать на территории России, а иммунитет к нему у основной части населения практически отсутствовал, что обусловило повышенную частоту постгриппозных осложнений. Эффективность серодиагностики гриппа А(Н1N1)pdm09 у ПЦР-положительных пациентов была в 1,5 раза выше по результатам реакции МН по сравнению с РТГА. В этой связи для расшифровки природы заболевания и оценки эпидситуации применение тестов с высокой диагностической чувствительностью играло первостепенное значение.

Активно обсуждаемой в литературе является проблема выбора маркеров предсказания протективного уровня противогриппозного гуморального иммунного ответа. В ранних работах было показано, что наличие в крови грипп-специфичных АТ с титром 1/40 по данным РТГА обеспечивает, по крайней мере, 50% снижение риска заражения гриппом в человеческой популяции [10, 15]. Однако в более поздних исследованиях было установлено, что этот показатель может сильно варьировать в зависимости от возраста пациентов, характеристик популяции, типа вакцины и особенностей заболевания [4, 5, 8, 22].

Так, титры АТ 1/40 против сезонных вирусов гриппа, определенные РТГА в сыворотках людей, были ассоциированы лишь с 22–31% защитой от заболевания. При этом 50% защита от гриппа А коррелировала с титрами АТ в РТГА, равными 1/110 у вакцинированных детей и 1/255–1/260 у привитых взрослых волонтеров [5, 22].

Оценка заболеваемости гриппом А(Н3N2) показала, что для достижения одного и того же уровня протекции титр вирусспецифичных АТ, определенный в РТГА, должен быть более чем в 4 раза выше у людей старше 65 лет, по сравнению с более молодыми пациентами [4].

Челлендж-наблюдения за волонтерами, инфицированными вирусом А(Н1N1)pdm09, показали, что между группами с высоким содержанием АТ ($\geq 1/40$ по данным РТГА) и низким уровнем АТ (титры ниже 1/40) не было выявлено достоверных различий в частоте проявления симптомов заболевания. При этом по сравнению с антигемагглютинирующей активностью большая корреляция с защитой от заболевания была показана для антинейраминидазной активности АТ [13].

Таким образом, вопрос о величине порога протективных гриппозных АТ в настоящее время дискутируется. Тем не менее, уровень АТ 1/40 принят за протективный в современных документах, регламентирующих оценку эффективности новых гриппозных вакцин методом РТГА [1, 8]. При этом данный параметр для реакции МН вообще не установлен. Условно протективный титр нейтрализующих АТ определяют, как правило, путем выявления нейтрализующей активности АТ, соответствующей титру 1/40 в РТГА. Этот показатель значительно варьирует и зависит от особенностей постановки метода МН в различных лабораториях [21].

Как правило, титры АТ, определенные в реакции МН для вирусов гриппа, коррелируют с титрами в РТГА, но превышают их. Так, по данным разных авторов, нейтрализующие титры АТ к вирусам гриппа А, соответствующие условно протективному титру 1/40 в РТГА, варьируют в широких пределах: 1/532–1/962 в иммунных сыворотках хорьков [19] и 1/40–1/275 у вакцинированных людей [6, 9, 21, 23]. При этом протективные титры АТ, оцененные в реакции МН, у взрослых людей были выше в 4 раза, чем у детей ($\geq 1/160$ и 1/40 соответственно) [6].

Выявленные нами пороги условно протективных титров нейтрализующих АТ к вирусам гриппа А у взрослых вакцинированных волонтеров и заболевших пациентов согласуются с результатами, полученными другими исследователями. В соответствии с этим при оценке эффективности вакцин защитными титрами АТ к вирусам гриппа А (H1N1)pdm09 и А (H3N2) в реакции МН должны считаться показатели не ниже 1/160 и 1/320, а не 1/40, как принято для РТГА. Следует отметить, что при таких пороговых значениях частота условно защитных титров АТ у волонтеров после вакцинации и переболевших пациентов была ниже по результатам реакции МН, чем РТГА. С учетом показанной большей чувствительности предложенного варианта постановки МН, эти данные ставят вопрос о заниженном критерии оценки протективности АТ методом РТГА (титр $\geq 1/40$), что обсуждается также в работах других исследователей.

Таким образом, предложенный вариант реакции МН является высокочувствительным методом и может быть рекомендован в качестве дополнительного теста при оценке эффективности новых гриппозных вакцин и серодиагностике гриппа.

Список литературы/References

1. Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации: Методические указания МУ 3.1.3490-17 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 27 октября 2017 г.) [Study of population immunity against influenza in the population of the Russian Federation: Methodical guideline MU 3.1.3490-17 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on October 27, 2017)].
2. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания МУ 3.3.2.1758-03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28 сентября 2003 г.) [Methods for determining the quality indicators of immunobiological preparations for the prevention and diagnosis of influenza: Methodological guidelines MU 3.3.2.1758-03 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on September 28, 2003)].
3. Alvarez M.M., López-Pacheco F., Aguilar-Yañez J.M., Portillo-Lara R., Mendoza-Ochoa G.I., García-Echauri S., Freiden P., Schultz-Cherry S., Zertuche-Guerra M.I., Bulnes-Abundis D., Salgado-Gallegos J., Elizondo-Montemayor L., Hernández-Torre M. Specific recognition of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum: a simple virus-free ELISA method. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 4: e10176. doi: 10.1371/journal.pone.0010176
4. Benoit A., Beran J., Devaster J.M., Esen M., Launay O., Leroux-Roels G., McElhaney J.E., Oostvogels L., van Essen G.A., Gaglani M., Jackson L.A., Vesikari T., Legrand C., Tibaldi F., Innis B.L., Dewé W. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection against seasonal A/H3N2 influenza disease. *Open Forum Infect. Dis.*, 2015, vol. 2, no. 2: ofv067. doi: 10.1093/ofid/ofv067
5. Black S., Nicolay U., Vesikari T., Knuf M., Del Giudice G., Della Cioppa G., Tsai T., Clemens R., Rappuoli R. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2011, vol. 30, pp. 1081–1085. doi: 10.1097/INF.0b013e3182367662
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2009, vol. 58, no. 19, pp. 521–524.
7. Ehrlich H.J., Müller M., Oh H.M., Tambyah P.A., Joukhadar C., Montomoli E., Fisher D., Berezuk G., Fritsch S., Löw-Baselli A., Vartian N., Bobrovsky R., Pavlova B.G., Pöllabauer E.M., Kistner O., Barrett P.N. Baxter H5N1 Pandemic Influenza Vaccine Clinical Study Team. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N. Engl. J. Med.*, 2008, vol. 358, no. 24, pp. 2573–2584. doi: 10.1056/NEJMoa073121
8. EMA, Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module. Draft. 2016.
9. Grund S., Adams O., Wählisch S., Schweiger B. Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *J. Virol. Methods*, 2011, vol. 171, no. 2, pp. 369–373. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.024
10. Hobson D., Curry R.L., Beare A.S., Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J. Hyg.*, 1972, vol. 70, pp. 767–777.

11. Lin Y., Gu Y., McCauley J.W. Optimization of a quantitative micro-neutralization assay. *J. Vis. Exp.*, 2016, vol. 118: e54897. doi: 10.3791/54897
12. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6373–6380.
13. Memoli M.J., Shaw P.A., Han A., Czajkowski L., Reed S., Athota R., Bristol T., Fargis S., Risos K., Powers J.H., Davey R.T., Taubenberger J.K. Evaluation of antihemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 2: e00417-16. doi: 10.1128/mBio.00417-16
14. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, vol. 22, no. 12, pp. 1084–1091. doi: 10.1177/22.12.1084
15. Potter C.W., Oxford J.S. Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br. Med. Bull.*, 1979, vol. 35, pp. 69–75.
16. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W., Fukuda K., Cox N.J., Katz J.M. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, pp. 937–943.
17. Rudenko L., Kiseleva I., Naykhin A.N., Erofeeva M., Stukova M., Donina S., Petukhova G., Pisareva M., Krivitskaya V., Grudinina M., Buzitskaya Zh., Isakova-Sivak I., Kuznetsova S., Larionova N., Desheva J., Dubrovina I., Nikiforova A., Victor J., Neuzil K., Flores J., Tsvetnitsky V., Kiselev O. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study of live attenuated H7N3 influenza vaccine. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2: e87962. doi: 10.1371/journal.pone.0087962
18. Serological diagnosis of influenza by microneutralization assay. WHO Manual. 2010.
19. Stephenson I., Das R.G., Wood J.M., Katz J.M. Comparison of neutralising antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine*, 2007, vol. 25, no. 20, pp. 4056–4063. PMID: 17412461. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.039
20. Stephenson I., Wood J.M., Nicholson K.G., Zambon M.C. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J. Med. Virol.*, 2003, vol. 70, pp. 391–398. doi: 10.1002/jmv.10408
21. Trombetta C.M., Montomoli E. Influenza immunology evaluation and correlates of protection: a focus on vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*, 2016, vol. 15, no. 8, pp. 967–976. doi: 10.1586/14760584.2016.1164046
22. Tsang T.K., Cauchemez S., Perera R.A., Freeman G., Fang V.J., Ip D.K., Leung G.M., Malik Peiris J.S., Cowling B.J. Association between antibody titers and protection against influenza virus infection within households. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 210, no. 5, pp. 684–692. doi: 10.1093/infdis/jiu186
23. Verschoor C.P., Singh P., Russell M.L., Bowdish D.M., Brewer A., Cyr L., Ward B.J., Loeb M. Correction: Microneutralization assay titres correlate with protection against seasonal influenza H1N1 and H3N2 in children. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 6: e0131531. doi: 10.1371/journal.pone.0131531
24. Zhu H., Ding X., Chen X., Yao P., Xu F., Xie R., Yang Z., Liang W., Zhang Y., Li Y., Shen J., He P., Guo Z., Su B., Sun S., Zhu Z. Neutralizing antibody but not hemagglutination antibody provides accurate evaluation for protective immune response to H5N1 avian influenza virus in vaccinated rabbits. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 33, pp. 5421–5423. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.067

Авторы:

Кривицкая В.З., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Кузнецова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Майорова В.Г., старший научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Кадырова Р.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Львов Н.И., д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;

Го А.А., к.м.н., врач-инфекционист клинко-диагностического отделения ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Соминина А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Krivitskaya V.Z., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, St. Petersburg, Russian Federation;

Kuznecova E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Majorova V.G., Senior Researcher, Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Kadyrova R.A., Junior Researcher, Laboratory of Cell Cultures, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Lvov A.I., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Professor of Department of Infectious Diseases, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation;

Go A.A., PhD (Medicine), Infectious Disease Physician, Clinical Diagnostic Department, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Sominina A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

NEXT-GENERATION SEQUENCING OF DRUG RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL ISOLATES IN LOW-INCIDENCE COUNTRIES

E. Sodja^a, N. Toplak^b, S. Koren^b, M. Kovač^b, S. Truden^a, M. Žolnir-Dovč^a

^a University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik, Golnik, Slovenia

^b Omega d.o.o., Ljubljana, Slovenia

Abstract. Drug resistant tuberculosis (TB), especially multidrug (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) TB, is still a serious problem in global TB control. Slovenia and North Macedonia are low-incidence countries with TB incidence rates of 5.4 and 10.4 in 2017, respectively. In both countries, the percentage of drug resistant TB is very low with sporadic cases of MDR-TB. However, global burden of drug-resistant TB continues to increase imposing huge impact on public health systems and strongly stimulating the detection of gene variants related with drug resistance in TB. Next-generation sequencing (NGS) can provide comprehensive analysis of gene variants linked to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, the aim of our study was to examine the feasibility of a full-length gene analysis for the drug resistance related genes (*inhA*, *katG*, *rpoB*, *embB*) using Ion Torrent technology and to compare the NGS results with those obtained from conventional phenotypic drug susceptibility testing (DST) in TB isolates. Between 1996 and 2017, we retrospectively selected 56 TB strains from our National mycobacterial culture collection. Of those, 33 TB isolates from Slovenian patients were isolated from various clinical samples and subjected to phenotypic DST testing in Laboratory for Mycobacteria (University Clinic Golnik, Slovenia). The remaining 23 TB isolates were isolated from Macedonian patients and sent to our laboratory for assistance in phenotypic DST testing. TB strains included were either mono-, poly- or multidrug resistant. For control purposes, we also randomly selected five TB strains susceptible to first-line anti-TB drugs. High concordance between genetic (Ion Torrent technology) and standard phenotypic DST testing for isoniazid, rifampicin and ethambutol was observed, with percent of agreement of 77%, 93.4% and 93.3%, sensitivities of 68.2%, 100% and 100%, and specificities of 100%, 80% and 88.2%, respectively. In conclusion, the genotypic DST using Ion Torrent semiconductor NGS successfully predicted drug resistance with significant shortening of time needed to obtain the resistance profiles from several weeks to just a few days.

Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistant tuberculosis, multidrug resistant tuberculosis, next-generation sequencing, Ion Torrent, phenotypic drug susceptibility testing.

Адрес для переписки:

Содья Эва
Голник 36, 4204 Голник, Словения, Национальная референс-лаборатория, Университетская клиника респираторных и аллергических заболеваний.
Тел.: +386 4 2569 409. Факс: +386 4 2569 117.
E-mail: eva.sodja@klinika-golnik.si

Contacts:

Sodja Eva
Golnik 36, 4204 Golnik, Slovenia, National Reference Laboratory, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik.
Phone: +386 4 2569 409. Fax: +386 4 2569 117.
E-mail: eva.sodja@klinika-golnik.si

Библиографическое описание:

Содья Э., Топлак Н., Корен С., Ковач М., Труден С., Жолнир-Довч М. Секвенирование следующего поколения лекарственноустойчивых клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* в странах с низким уровнем заболеваемости // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 773–778. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-773-778

Citation:

Sodja E., Toplak N., Koren S., Kovač M., Truden S., Žolnir-Dovč M. Next-generation sequencing of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in low-incidence countries // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 773–778. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-773-778

СЕКВЕНИРОВАНИЕ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОУСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *Mycobacterium tuberculosis* В СТРАНАХ С НИЗКИМ УРОВНЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ

Содья Э.¹, Топлак Н.², Корен С.², Ковач М.², Труден С.¹, Жолнир-Довч М.¹

¹ Университетская клиника респираторных и аллергических болезней, Голник, Словения

² Omega d.o.o., Любляна, Словения

Резюме. Лекарственноустойчивый туберкулез (ЛУ-ТБ), особенно ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) и ТБ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ), до сих пор представляет серьезную проблему глобального контроля ЛУ-ТБ. Словения и Северная Македония являются странами с низким уровнем заболеваемости ЛУ-ТБ, которые в 2017 г. составили 5,4 и 10,4 на 100 тыс. населения, соответственно. В обеих странах доля ЛУ-ТБ крайне низка, выявляются лишь спорадические случаи МЛУ-ТБ. Однако глобальный уровень ЛУ-ТБ продолжает расти, оказывая существенное влияние на систему здравоохранения, а также способствуя обнаружению генетических вариантов, связанных с ЛУ-ТБ. Секвенирование следующего поколения (next generation sequencing [NGS]) может предоставить возможность глубокого анализа генетических вариаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*. Целью настоящего исследования была оценка применимости анализа таких генов (*inhA*, *katG*, *rpoB*, *embB*) с использованием технологии Ion Torrent и сравнения данных NGS и стандартного фенотипического определения лекарственной чувствительности (drug susceptibility testing [DST]) изолятов ЛУ-ТБ. Было проведено ретроспективное исследование 56 ЛУ-ТБ штаммов, полученных в течение 1996–2017 гг. из Национальной коллекции культур микобактерий (Голник, Словения). Из них, 33 изолята было получено от пациентов из Словении из различных клинических образцов, подвергнутых фенотипическому тестированию DST в Лаборатории микобактерий (University Clinic Golnik, Slovenia). Остальные 23 изолята были выделены от пациентов из Северной Македонии, и переданы в нашу лабораторию для помощи в проведении тестирования DST. ЛУ-ТБ штаммы обладали моно-, поли- или множественной лекарственной устойчивостью. В качестве контрольных образцов были использованы случайным образом отобранные пять штаммов, чувствительных к противотуберкулезным препаратам первого ряда. В результате, показана высокая степень соответствия между генетическими (Ion Torrent) данными и результатами стандартного фенотипического DST для изониазида, рифампицина и этамбутола, с показателем согласия 77, 93,4 и 93,3%, чувствительностью — 68,2, 100 и 100%, специфичностью — 100, 80 и 88,2% соответственно. Таким образом, генотипическое тестирование лекарственной устойчивости с применением NGS в формате полупроводниковой технологии Ion Torrent успешно выявило лекарственную устойчивость с резким сокращением времени, необходимого для получения профиля резистентности — с нескольких недель до двух дней.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственноустойчивый туберкулез, туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, секвенирование следующего поколения, Ion Torrent, фенотипическое определение лекарственной чувствительности.

Introduction

Mycobacterium tuberculosis (MT), an obligate pathogen that causes tuberculosis (TB), is highly transmissible agent with significant morbidity and mortality. Global strategies to treat and control TB are designed to accurately and rapidly diagnose, treat and reduce the transmission of TB. The increasing burden of multidrug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) TB is a serious problem in global TB control. Slovenia and North Macedonia are countries with low incidence of TB cases with incidence rates 5.4 and 10.6 in 2017, respectively [1]. Moreover, in Slovenia in the period between 1996 and 2017 the average percentage of any drug resistance against isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamide (PZA), ethambutol (EMB) and streptomycin (SM) was 4.13%, dropping from 6.55% in 1996 to 1.89% in 2017. In the same period, 25 sporadic MDR-TB cases were observed with the last two cases

of MDR-TB noted in 2009 and in 2017. For North Macedonia, the average percentage of any drug resistance against INH, RIF, EMB and SM (they do not perform DST testing for PZA) was higher and accounted for 10.84%, dropping from 9.93% in 2001 to 5.81% in 2017. During 1996 and 2017 75 MDR-TB cases were observed in North Macedonia with MDR-TB cases appearing each year [2,3,4].

Currently, the reference method for determining drug resistance in clinical laboratory is culture based drug susceptibility testing (DST), using either solid or liquid media. However, this method is labour-intensive, time-consuming (due to slow growth of MT it takes weeks to months to obtain DST results), technically challenging and requires handling viable and potentially infectious cultures of MT bacilli [1].

As alternative to phenotypic DST, several commercially available molecular assays rapidly detect common mutations related to resistance to isoniazid, rifampicin and some second-line anti-TB

drugs. GeneXpert MTB/RIF Ultra assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) is a real-time PCR based assay that detects resistance directly from sputum samples. On the other hand, there are several line probe assays recommended by WHO, including GenoType MTBDRplus and MTBDRsl (Hain Lifescience, Nehren, Germany) and Nipro NTM + MDRTB II (Nipro Corporation, Osaka, Japan). However, the mechanisms of drug resistance are complex and not completely understood. Therefore, one of the main limitations of such molecular tests is that they evaluate only limited number of mutations linked with drug resistance in TB [9].

In recent years, significant and continued progress in next-generation sequencing (NGS) made this technology a promising clinical tool in comprehensive analysis of gene variants linked to drug resistance in TB [9]. Besides known mutations, NGS facilitates the discovery of novel variants in the entire coding regions of several genes previously implicated in MDR and/or XDR-TB resistance [9].

In this study, we examined the feasibility of a full-length gene analysis for the drug resistance related genes using Ion Torrent technology and compared the results with those obtained from conventional phenotypic drug susceptibility testing (DST) in 61

TB isolates. In this short paper, we compare molecular results with phenotypic DST results for isoniazid (INH), rifampicin (RIF) and ethambutol (EMB), anti-TB drugs used in first-line treatment regimens.

Materials and methods

TB strains. Between 1996 and 2017, we retrospectively selected 33 TB strains that were isolated from various clinical samples of Slovenian patients and subjected to phenotypic DST testing according to routine procedures in Laboratory for Mycobacteria (University Clinic Golnik, Slovenia). Between years 1999 and 2010, National Laboratory for Mycobacteria (Institute for Pulmonary Diseases and Tuberculosis Skopje, North Macedonia) sent to our laboratory 23 TB strains for assistance in phenotypic DST testing. TB strains included were either mono-, poly- or MDR resistant. For control purposes, we also randomly selected five TB strains susceptible to first-line anti-TB drugs. Detailed information about the type of resistance is presented in Table 1.

Phenotypic drug susceptibility (DST) testing. Phenotypic drug resistance to first-line drugs was determined using Bactec MGIT 960 System (BD) from pure culture of MT strains. Critical concentrations

Table 1. Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* (MT) strains included in the study according to resistance profile and country of origin

Resistance profile	Country of origin (survey period)		Number of TB patients
	Slovenia (1996–2017)	North Macedonia* (1999–2010)	
Sensitive	5	0	5
Mono-resistance	11	0	11
INH	2	0	2
RIF	3	0	3
PZA	6	0	6
Poly-resistance	6	1	7
PZA+SM	3	0	3
INH+PZA+SM	1	0	1
INH+PZA	2	0	2
INH+EMB+PZA+SM+FLQ	0	1	1
MDR	16	22	38
INH+RIF	1	7	8
INH+RIF+SM	1	0	1
INH+RIF+EMB	0	1	1
INH+RIF+PZA	0	3	3
INH+RIF+EMB+PZA	1	1	2
INH+RIF+EMB+SM	2	3	5
INH+RIF+PZA+SM	1	0	1
INH+RIF+EMB+PZA+SM	8	6	14
INH+RIF+EMB+PZA+SM+FLQ	2	1	3
Total	38	23	61

Notes. INH: Isoniazid; RIF: Rifampicin; EMB: Ethambutol; PZA: Pyrazinamide; SM: Streptomycin; FLQ: fluoroquinolones (either ofloxacin, ciprofloxacin or moxifloxacin); MDR: multi-drug resistance; resistance to (at least) INH and RIF; *National Laboratory for Mycobacteria (Institute for Pulmonary Diseases and Tuberculosis Skopje, North Macedonia) sent 23 TB strains for assistance in phenotypic DST testing.

Table 2. Comparison of NGS and phenotypic (BACTEC MGIT 960) drug susceptibility testing (DST) results for *Mycobacterium tuberculosis* (MT) isolates (N = 61)

NGS	Phenotypic DST		% of agreement	Sensitivity (%), 95% CI	Specificity (%), 95% CI	PPV (%), 95% CI	NPV (%), 95% CI
	Resistant	Susceptible					
Isoniazid* (N = 61)							
mutated	30	0	77.0	68.2 (72.3–94.8)	100.0 (80.5–100.0)	100.0 (90.8–100.0)	54.8 (51.6–89.8)
non-mutated	14	17					
Rifampicin (N = 61)							
mutated	41	4	93.4	100.0 (90.1–100.0)	80.0 (56.3–94.3)	91.1 (78.8–97.5)	100.0 (79.4–100.0)
non-mutated	0	16					
Ethambutol (N = 60**)							
mutated	26	4	93.3	100.0 (86.8–100.0)	88.2 (72.6–96.7)	86.7 (69.3–96.2)	100.0 (88.4–100.0)
non-mutated	0	30					

Notes. *Mutations in *inhA* and *katG* included in the comparison; **one TB isolate was not tested for ethambutol and was therefore excluded in further comparison; N: number of isolates included; NGS: next-generation sequencing (Ion Torrent, Ion AmpliSeq TB Research Panel, Thermo Fisher Scientific); 95% CI: 95% confidence interval; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value

for anti-TB drugs tested were as follows: INH 0.1 µl/ml (high level 0.4 µl/ml), RIF 1 µl/ml and EMB 5 µl/ml (high level 7.5 µl/ml).

DNA extraction. Mycobacterial genomic DNA was isolated from pure cultures of *M. tuberculosis* using previously described protocol [13]. Purified genomic DNA was stored at -20 °C in Slovenian National Mycobacterial DNA Collection until further analysis.

AmpliSeq Library preparation, sequencing, data analysis and interpretation. Nucleic acid quality and quantity were assessed using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) followed by agarose gel electrophoresis. All DNA samples were normalized to 10 ng in 15 µl of starting sample dilution. To identify gene variants related with drug resistance in genomic DNA extracted from MT isolates, AmpliSeq libraries were generated using the AmpliSeq™ Kit for Chef DL8 and the Ion AmpliSeq TB Research Panel. This panel amplifies 109 amplicons in two highly multiplexed PCR reactions covering coding sequences of eight genes related to drug resistance (including *inhA*, *katG*, *rpoB*, and *embB*). NGS libraries were prepared automatically using the Ion Chef instrument. The automated protocol performs targeted amplification, digestion, ligation, and normalization on eight samples without any user intervention. Prepared libraries were then automatically clonally amplified, enriched and sequenced on two Ion 530 Chips using the Ion Chef and Ion S5 instruments. Signal processing, base calling and variant caller analysis were performed with the Torrent Suite software version 5.6 (all reagents, instruments and software Thermo Fisher Scientific). The sequencing data were analysed manually, comparing the determined variants with published data and data available in the Tuberculosis Drug Resistance Database [7]. Sequence of MTB H37Rv (NC_000962.3) was used as the reference sequence. The resistance genotyping profiles obtained with manual approach were compared to the results of phenotypic DST testing. Sequence data are available in SRA NCBI database under BioProject accession number PRJNA551916.

Statistics. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for NGS were calculated using GraphPad Prism v 6.04 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Results and discussion

The NGS analysis was successfully used to predict drug resistance profiles. Percentage of agreement between both methods and corresponding sensitivities, specificities, positive predictive values and negative predictive values are presented in Table 2.

The percent of agreement between molecular and phenotypic DST testing in our study was the lowest for INH and accounted for 77% with sensitivity of 68.2% and specificity of 100%. The studies based

on susceptibility testing so far have not demonstrated complete agreement between the phenotypic and genotypic assays [6, 7, 12, 14, 16]. Hazbon и соавт. [6] reported in their study on a large number of TB isolates that around 34% of phenotypically resistant isolates are not associated with any genotypic mutations in genes most commonly linked to INH resistance (*katG*, *inhA*, *kasA*, *ahpC* and *ndh*), suggesting that many genetic causes of INH resistance are yet to be discovered. Supporting this data, recent systematic review [12] on INH resistance demonstrated that 84% of global phenotypic INH resistance is associated with mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC-oxvR* intergenic region, while the other 16% are, probably, linked to genetic changes in other genes.

Our study indicates high percentage of agreement between both methods used for RIF resistance testing (93.4%) with high sensitivity (100%) and specificity (80%). This is concordant with published literature [5, 10, 13] which reported very good agreement between genotypic and phenotypic DST. Zaw et al. [15] showed that mutations in *rpoB* gene (specifically mutations within 81-bp RIF-resistance determining region; RRDR) are responsible for approximately 95% of all RIF resistance cases in TB strains.

Similarly, we also noticed high percent of agreement between phenotypic and genotypic DST results for EMB (93.3%) with high sensitivity (100%) and specificity (88.2%). These results are concordant with some of the published studies [9, 10], which showed large overlap in the estimated prevalence of EMB resistance by genetic sequencing and the estimated prevalence by phenotypic testing. However, several other studies observed discrepancies between the presence of common mutations at codon 306 of *embB* gene and phenotypic EMB resistance [5,

8]. Authors of these studies determined mutations in *embB306* also in clinical *M. tuberculosis* isolates that are susceptible to EMB. One large study (with international TB isolates included) noted that almost half of the TB isolates with *embB306* mutations were fully susceptible to EMB. Furthermore, they found strong correlation between *embB306* mutations and resistance to any antibiotic, suggesting that *embB306* mutations were responsible for broad antibiotic resistance [5]. In our study with relatively low number of patients included, we observed 20 (20/60; 33.3%) TB isolates with *embB306* mutations. Of those 20 MT isolates that harboured *embB306* mutations, four (4/20; 20.0%) TB isolates that were phenotypically susceptible to EMB, remaining 16 (16/20; 80.0%) TB isolates were phenotypically resistant to EMB.

Overall, this study describes the first utilization of Ion Torrent sequencing of full-length genes to characterize drug resistant MT isolates for In conclusion, genotypic DST using Ion Torrent semiconductor NGS has the potential to provide useful information several weeks before phenotypic DST results. Therefore, genetic sequencing (NGS) seems to be a valuable tool for surveillance of drug resistance in TB. Before this takes place, there is a need to standardise the whole procedure including DNA extraction, recording, and reporting and data interpretation.

Acknowledgements

The authors of this paper would like to thank Cveta Vragoterova from National Laboratory for Mycobacteria (Institute for Pulmonary Diseases and Tuberculosis Skopje, North Macedonia) for allowance and contribution of Macedonian TB isolates in our study.

References

1. Cegielski J.P., Kurbatova E., van der Walt M., Brand J., Ershova J., Tupasi T., Caoili J.C., Dalton T., Contreras C., Yagui M., Bayona J., Kvasnovsky C., Leimane V., Kuksa L., Chen M.P., Via L.E., Hwang S.H., Wolfgang M., Volchenkov G.V., Somova T., Smith S.E., Akksilp S., Wattanaamornkiet W., Kim H.J., Kim C.K., Kazenny B.Y., Khorosheva T., Kliiman K., Viiklepp P., Jou R., Huang A.S., Vasilyeva I.A., Demikhova O.V.; Global PETTS Investigators, Lancaster J., Odendaal R., Diem L., Perez T.C., Gler T., Tan K., Bonilla C., Jave O., Asencios L., Yale G., Suarez C., Walker A.T., Norvaisha I., Skenders G., Sture I., Riekstina V., Cirule A., Sigman E., Cho S.N., Cai Y., Eum S., Lee J., Park S., Jeon D., Shamputa I.C., Metchock B., Kuznetsova T., Akksilp R., Sitti W., Inyapong J., Kiryanova E.V., Degtyareva I., Nemtsova E.S., Levina K., Danilovits M., Kummik T., Lei Y.C., Huang W.L., Erokhin V.V., Chernousova L.N., Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Smirnova T.G. Multidrug-resistant tuberculosis treatment outcomes in relation to treatment and initial versus acquired second-line drug resistance. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, vol. 62, no. 4, pp. 418–430.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA – January 2016. *Stockholm: ECDC*, 2016.
3. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018. 2016 data. 206 p. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/ecdc-tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2018-19mar2018.pdf>
4. Global tuberculosis report 2017. *Geneva: World Health Organization*, 2017. 295 p. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>
5. Hazbón M.H., Bobadilla del Valle M., Guerrero M.I., Varma-Basil M., Filliol I., Cavatore M., Colangeli R., Safi H., Billman-Jacobe H., Lavender C., Fyfe J., García-García L., Davidow A., Brimacombe M., León C.I., Porrás T., Bose M., Chaves F., Eisenach K.D., Sifuentes-Osornio J., Ponce de León A., Cave M.D., Alland D. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 9, pp. 3794–3802. doi: 10.1128/AAC.49.9.3794-3802.2005

6. Hazbón M.H., Brimacombe M., Bobadilla del Valle M., Cavatore M., Guerrero M.I., Varma-Basil M., Billman-Jacobe H., Lavender C., Fyfe J., García-García L., León C.I., Bose M., Chaves F., Murray M., Eisenach K.D., Sifuentes-Osornio J., Cave M.D., Ponce de León A., Alland D. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 8, pp. 2640–2649. doi: 10.1128/AAC.00112-06
7. Kim S.Y., Park Y.J., Kim W.I., Lee S.H., Ludgerus Chang C., Kang S.J., Kang C.S. Molecular analysis of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from South Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, vol. 47, no. 3, pp. 497–502.
8. Mokrousov I., Otten T., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. Detection of embB306 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 10, pp. 3810–3813.
9. Park J., Jang W., Kim M., Kim Y., Shin S.Y., Park K., Kim M.S., Shin S.J. Molecular drug resistance profiles of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens using ion semiconductor sequencing. *Microbiol. Methods*, 2018, vol. 145, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.mimet.2017
10. Park J., Shin S.Y., Kim K., Park K., Shin S., Ihm C. Determining Genotypic Drug Resistance by Ion Semiconductor Sequencing With the Ion AmpliSeq™ TB Panel in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Ann. Lab. Med.*, 2018, vol. 38, no. 4, pp. 316–323. doi: 10.3343/alm.2018.38.4.316
11. Sandgren A., Strong M., Muthukrishnan P., Weiner B.K., Church G.M., Murray M.B. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med.*, 2009, vol. 6, no. 2: e2. doi: 10.1371/journal.pmed.1000002
12. Seifert M., Catanzaro D., Catanzaro A., Rodwell T.C. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3: e0119628. doi: 10.1371/journal.pone.0119628
13. Somerville W., Thibert L., Schwartzman K., Behr M. A. Extraction of Mycobacterium tuberculosis DNA: a question of containment. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, pp. 2996–2997. doi: 10.1128/JCM.43.6.2996-2997.2005
14. Unissa A.N., Subbian S., Hanna L.E., Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.*, 2016, vol. 45, pp. 474–492. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.004
15. Zaw M.T., Emran N.A., Lin Z.J. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Public. Health.*, 2018, vol. 11, no. 5, pp. 605–610. doi: 10.1016/j.jiph.2018.04.005
16. Zignol M., Cabibbe A.M., Dean A.S., Glaziou P., Alikhanova N., Ama C., Andres S., Barbova A., Borbe-Reyes A., Chin D.P., Cirillo D.M., Colvin C., Dadu A., Dreyer A., Driesen M., Gilpin C., Hasan R., Hasan Z., Hoffner S., Hussain A., Ismail N., Kamal S.M.M., Khanzada F.M., Kimerling M., Kohl T.A., Mansjö M., Miotto P., Mukadi Y.D., Mvusi L., Niemann S., Omar S.V., Rigouts L., Schito M., Sela I., Seyfaddinova M., Skenders G., Skrahina A., Tahseen S., Wells W.A., Zhurilo A., Weyer K., Floyd K., Raviglione M.C. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. *Lancet. Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 6, pp. 675–683. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30073-2

Авторы:

Содья Э., кандидат наук, научный сотрудник Национальной микобактериологической референс-лабораторией, Университетская клиника респираторных и аллергических заболеваний, Голник, Словения;

Топлак Н., кандидат наук, специалист в области молекулярной биологии, научная группа Omega d.o.o., Любляна, Словения;

Корен С., кандидат наук, менеджер Life Science Perkin Elmer и научной группы Omega d.o.o., Любляна, Словения;

Ковач М., кандидат наук, менеджер по продажам Thermo Fisher Scientific и научной группы Omega d.o.o., Любляна, Словения;

Труден С., магистр, специалист Национальной микобактериологической референс-лаборатории, Университетская клиника респираторных и аллергических заболеваний, Голник, Словения;

Жолнир-Довч М., кандидат наук, зав. Национальной микобактериологической референс-лабораторией, Университетская клиника респираторных и аллергических заболеваний, Голник, Словения.

Authors:

Sodja E., PhD, Research Associate, National Reference Laboratory for Mycobacteria, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik, Golnik, Slovenia;

Toplak N., PhD, Field Application Specialist for Molecular Biology, Research Team of Omega d.o.o., Ljubljana, Slovenia;

Koren S., PhD, Manager of Life Science Perkin Elmer and Field Application Specialist, Research Team of Omega d.o.o., Ljubljana, Slovenia;

Kovač M., PhD, Manager of Thermo Fisher Scientific Sales Team and Research Team of Omega d.o.o., Ljubljana, Slovenia;

Truden S., MSc, Analytics, National Reference Laboratory for Mycobacteria, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik, Golnik, Slovenia;

Žolnir-Dovč M., PhD, Head of National Reference Laboratory for Mycobacteria, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik, Golnik, Slovenia.

АНАЛИЗ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИВИВОК ДЕТСКОГО И ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ РФ ПРОТИВ ДИФТЕРИИ, СТОЛБНЯКА, КОРИ И ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В

Н.П. Галина, А.Я. Миндлина, Р.В. Полибин

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. В настоящее время наблюдается тенденция увеличения заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями как в Российской Федерации, так и во многих европейских странах. Этот рост определяется целым рядом причин, в том числе потерей настороженности у медицинских работников в необходимости соблюдения качества иммунопрофилактики. Вакцинация на сегодняшний день является наиболее эффективным профилактическим мероприятием в борьбе с инфекционными болезнями. Однако эффективность вакцинации напрямую зависит от охвата прививками и своевременности проведения вакцинации. *Материалы и методы.* Нами был проанализирован охват и своевременность проведения прививок против дифтерии, столбняка, кори и вирусного гепатита В населения Российской Федерации, г. Москвы, трех детских и трех взрослых поликлиник г. Москвы. *Результаты.* Детское население привито против этих инфекций лучше, чем взрослое. Однако при охвате против всех инфекций в 95% и выше, имеются недостатки в своевременности проведения прививок. Против дифтерии и столбняка в 2017 г., несмотря на то что вакцинация должна начинаться в 3 месяца, а заканчиваться в 6 месяцев, к этому возрасту привито всего лишь 46,9% в РФ, 48,7% в Москве, а в отдельных детских поликлиниках — от 21,8% в 2012 г. до 1,7% в 2017 г. Ситуация с проведением ревакцинации еще сложнее. В возрасте 18 месяцев в РФ ревакцинировано 50%, в Москве — 54%, в отдельных детских поликлиниках — от 49 до 55%. В возрасте 7 и 14 лет в РФ ревакцинировано 97%. Похожая ситуация с вакцинацией против гепатита В: законченный курс вакцинации к 6 месяцам получает всего лишь 49% в РФ и в г. Москве. Более 90% охват достигается только в возрасте 1 года. Охват вакцинацией взрослого населения против гепатита В лучше, чем против дифтерии и столбняка, и достигает выше 85%. Охват прививками против кори в РФ во всех возрастах выше 95%. Таким образом, необходимо оптимизировать работу по соблюдению своевременности вакцинации, поскольку снижение качества вакцинации неизбежно приводит к увеличению заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями. Изменить ситуацию со своевременностью проведения прививок и достижения необходимого охвата можно с внедрением автоматизированной системы учета профилактических прививок в Российской Федерации.

Ключевые слова: вакцинация, иммунизация, своевременность вакцинации, охват прививками, вакциноуправляемые инфекции, корь, дифтерия, столбняк, гепатит В, коклюш.

Адрес для переписки:

Галина Наталья Павловна
119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова.
Тел.: 8 962 939-25-53 (моб.).
E-mail: greenday_billie@mail.ru

Contacts:

Natalia P. Galina
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8, bldg 2,
Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 962 939-25-53 (mobile).
E-mail: greenday_billie@mail.ru

Библиографическое описание:

Галина Н.П., Миндлина А.Я., Полибин Р.В. Анализ организации прививок детского и взрослого населения РФ против дифтерии, столбняка, кори и вирусного гепатита В // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 779–786. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-779-786

Citation:

Galina N.P., Mindlina A.Ya., Polibin R.V. Surveying children and adult vaccination program against diphtheria, tetanus, measles and viral hepatitis B in the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 779–786. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-779-786

SURVEYING CHILDREN AND ADULT VACCINATION PROGRAM AGAINST DIPHTHERIA, TETANUS, MEASLES AND VIRAL HEPATITIS B IN THE RUSSIAN FEDERATION

Galina N.P., Mindlina A.Ya., Polibin R.V.

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Over the last years, incidence of vaccine-preventable infections tended to increase both in Russia and multiple European countries due to diverse reasons, including loss of alertness in medical workers to ensure proper quality of immunization. Currently, vaccination is considered to be the most efficient means for preventing infectious diseases. However, vaccination efficacy is directly related to population coverage and proper timeframe for its application. *Materials and methods.* Diphtheria, tetanus, measles and hepatitis B vaccination coverage and timeframe were analyzed for population of Russia, Moscow as well as the three pediatric and adult out-patient hospitals. *Results.* It was found that compared to adults, pediatric subjects were vaccinated better. However, in case of 95% or higher coverage against all infections, shortcomings in vaccination timeframe were uncovered. In 2017, despite pediatric subjects should be vaccinated against diphtheria and tetanus at the age of 3-to-6 months, coverage was as low as 46.9% in Russia, 48.7% in Moscow that ranged in some polyclinics from 21.8% in 2012 down to 1.7% in 2017. Moreover, this situation was even more unfavorable in case of revaccination program. In particular, it was found that at the age of 18 months only 50, 54, and 49–55% underwent revaccination in the Russia, Moscow 54%, and some out-patient hospitals, whereas at the age of 7–14 years in Russia there were revaccinated up to 97% population. Likewise, at the age of 6 months there were covered with vaccination against hepatitis B as few as 49% population in Russia and Moscow, whereas more than 90% coverage was achieved only at the age of 1 year. Immunization coverage reaching more than 85% of adult population against hepatitis B is superior to diphtheria and tetanus. Immunization coverage against measles in Russia at all age groups was over 90% population. Thus, it is necessary to optimize activities on adhering to vaccination timeframe, as decline in quality of vaccination inevitably leads to elevated incidence rate of vaccine-preventable infections. This and vaccination coverage might be adjusted by introducing a Preventive Vaccination Surveillance and Reporting Automated System in the Russian Federation.

Key words: vaccination, immunization, timely vaccination, vaccination coverage, vaccine-preventable infections, measles, diphtheria, tetanus, hepatitis B, pertussis.

Вакцинация на сегодняшний день является наиболее эффективным профилактическим мероприятием в борьбе с инфекционными болезнями. Благодаря проведению массовой вакцинации населения удалось существенно снизить заболеваемость и смертность от многих инфекций. В настоящее время иммунизация позволяет предотвращать предположительно от 2 до 3 млн случаев смерти от дифтерии, столбняка, коклюша и кори в год [17, 19]. Доказана и экономическая эффективность вакцинации. Так, например, на ликвидацию натуральной оспы в мире в течение 10 лет, потребовалось 100 млн долларов США, что в итоге привело к ежегодной экономии 1,3 млрд долларов, потребовавшихся бы для лечения этой инфекции [12, 18].

Не стоит забывать и о том, что сегодня — в век развитой транспортной коммуникации — невозможно сдерживать различные инфекционные болезни (например, такие контагиозные, как корь) в отдельно взятой стране [4, 15].

Благодаря массовой иммунизации против гепатита В сегодня число детей, болеющих гепатитом В в острой форме, исчисляется единицами (в 2016 г. — 20 детей до 17 лет). Однако охват новорожденных прививками против гепатита В и туберкулеза в роддоме снижается. До 25% детей до 2-х лет не получают законченный курс иммунизации против коклюша. Неуспех элиминации кори напрямую зависит от недостаточного охвата населения прививками [3]. С 2010 г. нача-

лась работа по подготовке к сертификации территории РФ как свободной от кори [9]. Однако в 2010 г. в России, вслед за Европой, начался рост заболеваемости корью, который сопровождался увеличением заболевших во всех возрастных группах [11, 13, 14, 16, 20].

Ретроспективный анализ заболеваемости корью в РФ и на ее административных территориях, изучение напряженности и длительности гуморального иммунитета к вирусу кори у детей, показывают, что только в случае ежегодного достижения и поддержания уровня охвата вакцинацией и ревакцинацией в установленные сроки не менее 95–98% детей будут созданы условия для элиминации кори [8, 10].

Вместе с тем для поддержания эпидемиологического благополучия по тем или иным инфекциям необходимо продолжать иммунизацию населения с большим охватом и поддерживать высокий уровень коллективного иммунитета, невзирая на низкую заболеваемость или отсутствие инфекции на территории. Сокращение иммунной прослойки приводит к возвращению инфекции. Наша страна имеет печальный опыт возвращения вакциноуправляемых инфекций, по которым было достигнуто стойкое эпидемиологическое благополучие.

Одной из первых инфекций, на примере которой, была убедительно продемонстрирована реальность управления эпидемиологическим процессом, была дифтерия. И, как следствие

успеха проведения иммунопрофилактики, начало снижаться внимание к этой инфекции. Примером могут быть случаи заболеваний дифтерией в локальных эпидемических очагах в 1969–1971 гг. в воинских коллективах. Эти заболевания первоначально расценивались как проявления ангины, так как в ряде регионов дифтерия не регистрировалась в течение 5–10 лет и врачи не сразу могли выставить нужный диагноз и, как следствие, провести необходимые и своевременные лечебные и противоэпидемические мероприятия [2].

При этом, несмотря на активизацию эпидемического процесса и сходную обстановку в европейских странах, руководство системы здравоохранения медлило, а уровень заболеваемости населения страны с 1976 г. ежегодно увеличивался на 150–200%. Только к 1986 г. начали предприниматься попытки усиления мер борьбы с дифтерией, удалось обязать военкоматы организовывать ревакцинацию молодежи призывного возраста, но она проводилась далеко не всем и часто документально должным образом не оформлялась [1]. Социально-экономический кризис 90-х гг. вернул заболеваемость населения дифтерией на уровень довакцинального периода. В 1994–1995 гг. в странах СНГ тогда заболело около 40 тыс. человек, умерло более 6000.

В настоящее время ситуация с охватом профилактическими прививками в нашей стране достаточно благополучная: против большинства вакциноуправляемых инфекций он составляет более 95%. При этом не должен активизироваться эпидемический процесс кори, коклюша и других вакциноуправляемых инфекций, что к сожалению сегодня происходит. Однако эффективность вакцинации напрямую зависит не только от охвата прививками, но и от своевременности проведения вакцинации, особенно в современный период низких уровней заболеваемости.

В связи с этим целью нашего исследования было проанализировать охват и своевременность проведения прививок против дифтерии, столбняка, коклюша, кори и гепатита В детского и взрослого населения РФ.

Материалы и методы

Проведен анализ заболеваемости корью, гепатитом В, дифтерией и коклюшем в РФ, г. Москве, и ЗАО г. Москвы по форме № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за период с 2016 по 2018 год.

Анализ охвата прививками против дифтерии, столбняка, коклюша, кори и гепатита В декретированных возрастов детского населения РФ, г. Москвы, Западного административного округа (ЗАО) г. Москвы, проводился по выборке

данных из формы № 6 «Сведения о контингентах детей и взрослых, привитых против инфекционных заболеваний» за 2016 и 2017 гг. Также было проведено выборочное исследование организации проведения вакцинации в трех детских городских поликлиниках и трех взрослых городских поликлиниках по документации, содержащей сведения о своевременности проведения вакцинации в период с 2014 по 2017 гг.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием метода доверительных интервалов при помощи программы Excel.

Результаты

Эпидемическая ситуация по дифтерии на всех анализируемых территориях была благополучной. В настоящее время регистрируются единичные случаи этого заболевания: 2014 г. — 1 случай, 2015 и 2016 гг. — 2 случая, 2017 г. — ни одного случая, однако в 2018 г. зарегистрировано 4 случая заболевания дифтерией. Для сравнения: в 2007 г. был зарегистрирован 91 случай заболевания дифтерией, из них 29 случаев у детей до 17 лет. Последний случай заболевания дифтерией в ЗАО города Москвы был зарегистрирован в 2012 г. Можно считать, что ужесточение противоэпидемических мероприятий и массовая иммунизация всего населения, «подчищающая» вакцинация, национальные Дни прививок, серьезные законодательные меры правительства и помощь ВОЗ постепенно сказались на ситуации с заболеваемостью дифтерией. В настоящее время можно констатировать, что дифтерия, благодаря массовой вакцинации населения в глобальном масштабе, снова стала управляемой инфекцией [1, 7].

Перестал представлять серьезную эпидемиологическую проблему с введением вакцинации и вирусный гепатит В. Заболеваемость острым вирусным гепатитом В в Российской Федерации имеет тенденцию к снижению: если в 2007 г. заболеваемость составляла 5,28 на 100 тыс. населения, то к 2018 г. этот показатель составил 0,67 на 100 тыс. населения. Среди детей в возрасте до 17 лет и детей до года показатели заболеваемости также снижаются (2007 г.: до 17 лет — 0,8 на 100 тыс. населения, дети до года — 1,65; 2018 г.: 0,05 и 0,28 соответственно), однако случаи заболевания детей все же регистрируются. В Западном административном округе г. Москвы в 2007 г. заболеваемость составляла 2,86 на 100 тыс. населения, а к 2018 г. снизилась до 1,35 на 100 тыс. населения. Случаи заболевания среди детей до 17 лет в ЗАО не регистрировались с 2009 г. Однако эта ситуация может измениться при ослаблении внимания к этой инфекции, уменьшении охвата прививками и несоблюдении схемы иммунизации.

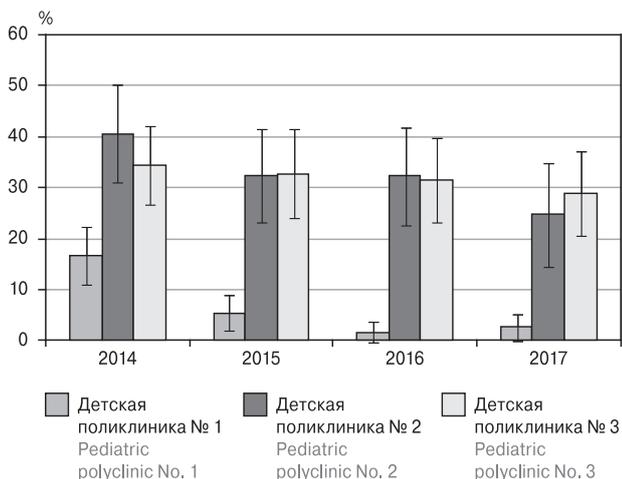


Рисунок 1. Своевременность проведения вакцинации против дифтерии, коклюша и столбняка детского населения детских поликлиник г. Москвы в возрасте 3 месяцев

Figure 1. Timeliness of vaccination against diphtheria, pertussis and tetanus of the children of Moscow pediatric polyclinics at the age of 3 months

Это хорошо видно на примере кори и коклюша. В последнее время наблюдается ухудшение эпидемической ситуации по кори и коклюшу. Так в 2016 г. в РФ всего заболело корью 178 человек (0,12 на 100 тыс. населения), в г. Москве заболело 16 человек (0,13 на 100 тыс. населения), в ЗАО г. Москвы не было зафиксировано ни одного случая заболевания. В 2017 г. в РФ зарегистрирован уже 721 случай (0,49 на 100 тыс. населения), в Москве — 330 случаев (2,67 на 100 тыс. населения), и появились случаи в ЗАО г. Москвы,

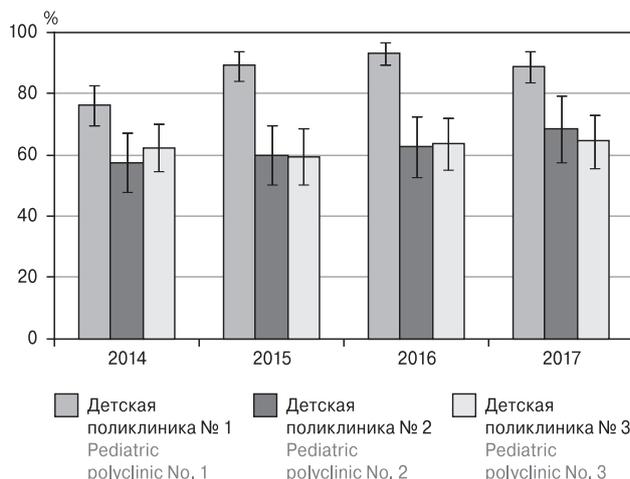


Рисунок 2. Своевременность проведения вакцинации против дифтерии, коклюша и столбняка детского населения детских поликлиник г. Москвы в возрасте 4,5 месяцев

Figure 2. Timeliness of vaccination against diphtheria, pertussis and tetanus of the children of Moscow pediatric polyclinics at the age of 4,5 months

в котором было зарегистрировано 13 случаев заболевания корью (0,97 на 100 тыс. населения). В 2018 г. в ЗАО г. Москвы было зарегистрировано уже 84 случая кори (6,31 на 100 тыс. населения), а по состоянию на 10 апреля 2019 г. — 39 лабораторно подтвержденных случаев.

Увеличивается также количество случаев заболевания коклюшем в ЗАО г. Москвы: если в 2017 г. было зарегистрировано 78 случаев (5,86 на 100 тыс. населения), то за 2018 г. зарегистрировано уже 200 случаев заболевания коклюшем (15,04 на 100 тыс. населения).

При этом проведенное исследование охвата вакцинацией показало, что детское население привито против дифтерии, столбняка, кори и вирусного гепатита В лучше, чем взрослое. Однако имеются недостатки в организации проведения прививок, в частности в своевременности проведения прививок против дифтерии, столбняка и гепатита В.

Результаты оценки охвата вакцинацией против дифтерии, столбняка и коклюша

В целом по РФ против дифтерии, столбняка и коклюша в 2017 г., несмотря на то что вакцинация должна начинаться в 3 месяца, а заканчиваться в 6 месяцев, к этому возрасту привито всего лишь 46,9% в РФ и 48,7% в Москве.

По результатам выборочных исследований в отдельных поликлиниках доля детей, привитых своевременно еще меньше, наблюдается тенденция к постоянному снижению. Если в 2012 г. был привит своевременно в 3 месяца 21% детей, то к 2017 г. этот показатель сократился до 1,7% (различия достоверны, $p < 0,05$) (рис. 1).

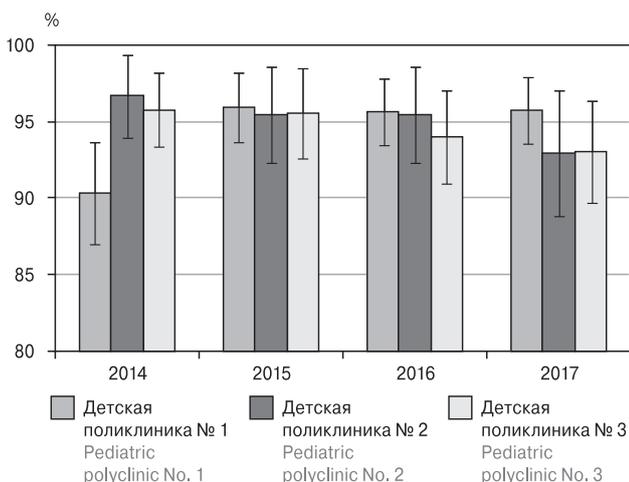


Рисунок 3. Своевременность проведения вакцинации против дифтерии, коклюша и столбняка детского населения детских поликлиник г. Москвы в возрасте 6–11 месяцев

Figure 3. Timeliness of vaccination against diphtheria, pertussis and tetanus of the children of Moscow pediatric polyclinics at the age of 6–11 months

Не более 40% детей по всем трем поликлиникам начинают прививать в 3 месяца, а охват первой прививкой достигается только после возраста 6 месяцев (рис. 2). Охват полным курсом вакцинации достигается к 2–3 годам.

Следует отметить, что при наличии достоверных различий ($p < 0,05$), ситуация в детской городской поликлинике Х002 лучше, чем в детской городской поликлинике Х001, но имеется общая закономерность к снижению. Важно обратить внимание на тот факт, что более 90% охвата вакцинацией в РФ, в г. Москве, в ЗАО г. Москвы и детских городских поликлиниках фиксируется только в возрасте после 6 месяцев (рис. 3).

Ситуация со своевременностью проведения ревакцинации еще сложнее. В 2017 г. в возрасте 18 месяцев ревакцинировано не более 50% детей в РФ, 54% в г. Москве и ЗАО г. Москвы. Следует отметить, что 98% охват первой ревакцинацией достигается только к 4 годам, что свидетельствует о проведении ревакцинации со значительным опозданием. В возрасте 6–7 лет ревакцинировано своевременно до 97% в Москве и в целом по РФ, в ЗАО г. Москвы до 87%, что выше, чем в предыдущем году — около 70% по РФ и г. Москве. В возрасте 14 лет ревакцинировано своевременно в целом по РФ 97,5% детей (различия достоверны, $p < 0,05$) (рис. 4).

Результаты выборочного исследования по поликлиникам показывают, что своевременная ревакцинация в 18 месяцев проводится также не более чем у 50% детей. Вторая ревакцинация в 6–7 лет проводилась своевременно у 33–55% детей в 2014–2015 гг. К 2017 г. ситуация со своевременностью проведения второй ревакцинации несколько улучшилась и своевременно ревакцинировано до 87% детей, а третья ревакцинация проводится своевременно у более 96% детей.

Охват ревакцинацией во взрослом возрасте в РФ является крайне недостаточным и чуть превышает 70%. Следует отметить, что охват ревакцинацией людей в возрасте старше 60 лет находится на самом низком уровне и не превышает 34% в Москве и 42% по результату выборочного исследования взрослых поликлиник. Лучше всего привито население молодого возраста (18–35 лет) (рис. 5).

Результаты оценки охвата вакцинацией против вирусного гепатита В

Похожая ситуация обстоит с вакцинацией против гепатита В. Охват вакцинацией против гепатита В, как по данным официальной статистики, так и по данным выборочного исследования детских поликлиник, составляет примерно 50% по достижению возраста 11 месяцев. Охват в 92% и выше достигается в возрасте после 6 месяцев, из чего можно сделать

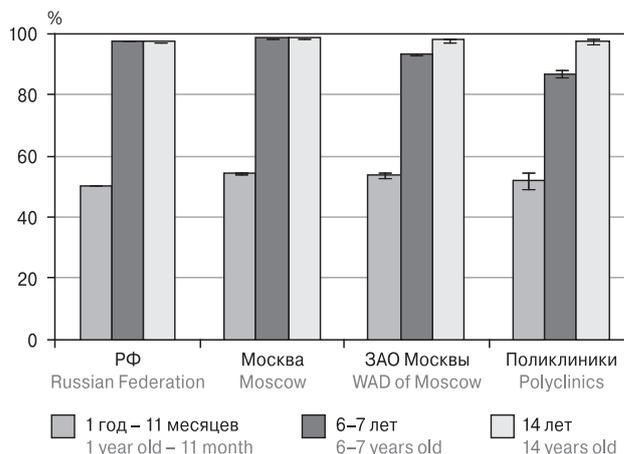


Рисунок 4. Своевременность проведения ревакцинации против дифтерии, и столбняка детского населения РФ, г. Москвы, ЗАО г. Москвы и детских поликлиник г. Москвы в 2017 г.

Figure 4. Timeliness of booster vaccination against diphtheria and tetanus of the child's population of Russian Federation, Moscow, Western administrative district of Moscow and Moscow pediatric polyclinics in 2017

вывод, что вакцинация начинается с опозданием — не раньше возраста 6 месяцев, хотя должна в этом возрасте уже заканчиваться (рис. 6).

Охват вакцинацией взрослого населения против гепатита В в возрасте 18–35 лет более 90%, в возрасте 36–59 лет этот показатель ниже — около 80% в РФ и г. Москве, и около 68% по результату выборочного исследования. Высокие показатели охвата прививками против гепатита В могут быть объяснены наличием групп риска (рис. 7).

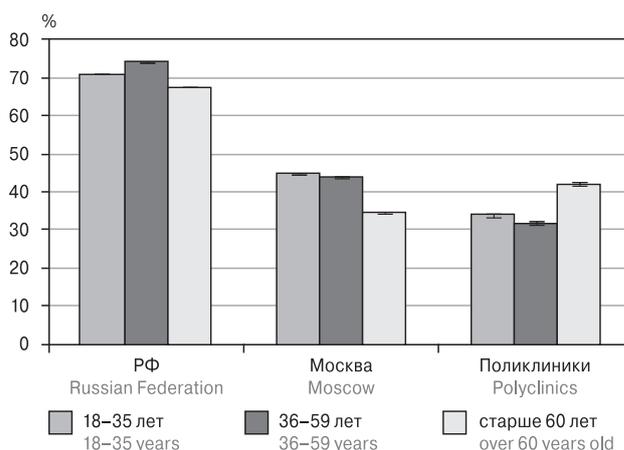


Рисунок 5. Охват ревакцинацией против дифтерии и столбняка взрослого населения РФ, г. Москвы и взрослых поликлиник г. Москвы в 2017 г.

Figure 5. Coverage against diphtheria and tetanus of the adult population of the Russian Federation, Moscow and adult polyclinics in 2017

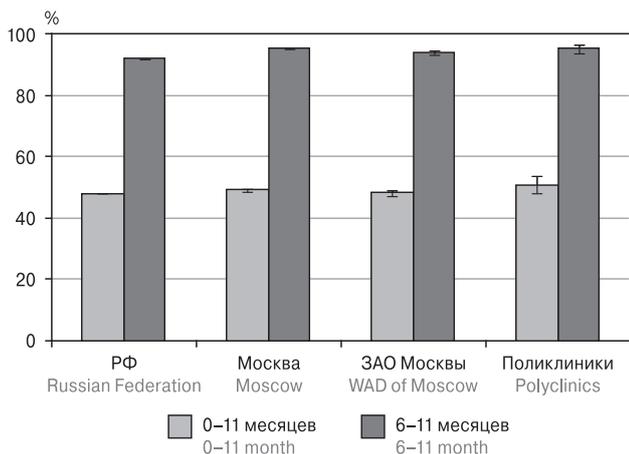


Рисунок 6. Своевременность проведения вакцинации против гепатита В детского населения РФ, г. Москвы, ЗАО г. Москвы и детских поликлиник г. Москвы в 2017 г.

Figure 6. Timeliness of vaccination against hepatitis B of the child's population of Russian Federation, Moscow, Western administrative district of Moscow and Moscow pediatric polyclinics in 2017

Несколько лучше обстоит ситуация с прививками против кори: охват прививками в РФ среди декретированных групп около 95%. По национальному календарю взрослые люди прививаются до 35 лет, а по календарю профилактических прививок по эпидпоказаниям прививаются все люди без ограничения возраста. Тем не менее, утверждать наверняка, что вакцинация проводится своевременно в 1 год и 6 лет невозможно, так как по статистическим данным оценивать можно лишь интервал возраста от 1 года до 2 лет, а ревакцинации —

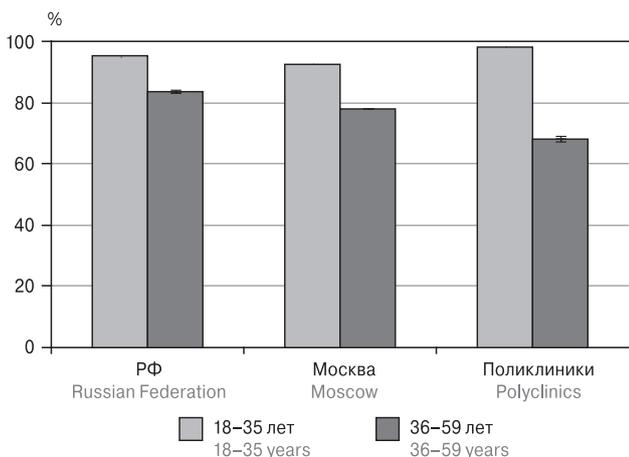


Рисунок 7. Охват вакцинацией против гепатита В взрослого населения РФ, г. Москвы и взрослых поликлиник г. Москвы в 2017 г.

Figure 7. Coverage against hepatitis B of the adult population of the Russian Federation, Moscow and adult polyclinics in 2017

от 6 лет до 7 лет. И несмотря на высокие цифры охвата вакцинацией, заболеваемость этой инфекцией продолжает расти. Заболевают чаще всего непривитые дети, а также непривитые или имеющие только лишь одну вакцинацию люди возрастной группы 30–40 лет. При регистрации случаев заболевания корью в домашних очагах, в организованных коллективах (как детских, так и во взрослых по месту их работы) проводится активная работа по вакцинации непривитых людей. Роспотребнадзором принято решение о проведении «подчищающей» вакцинации.

Обсуждение и выводы

Несмотря на то что в настоящее время заболеваемость многими вакциноуправляемыми инфекциями находится на невысоком уровне, а некоторые инфекции не регистрируются вообще, ситуация остается нестабильной и напряженной. Назрела необходимость оптимизации организационно-методических основ проведения иммунопрофилактики.

Требуют совершенствования иммунологические исследования по оценке эффективности проводимой иммунопрофилактики, мониторинг поствакцинальных реакций и осложнений, изучению иммунологической структуры населения, слежению за скрытопротекающим эпидемиологическим процессом [3]. Существует необходимость специализированного обучения вопросов вакцинопрофилактики медицинских работников всех специальностей, в том числе в отношении нежелательных явлений в поствакцинальном периоде [6].

Однако, как это уже бывало, по мере достижения успехов в иммунопрофилактике актуальных инфекций постепенно растет количество отказов от вакцинации; в структуре причин непривитости населения отказ от вакцинации занимает ведущее место. К числу прочих причин непривитости относится увеличение доли взрослого населения, получающего медицинские услуги в частных медицинских клиниках [5].

Снижение внимания медицинских работников к иммунопрофилактике на сегодняшний момент недопустимо и неминуемо приведет к трагическим последствиям. Вспышки кори уже регистрируются на территориях воинских частей, детских садов, что ни в коем случае нельзя игнорировать. Увеличивается количество отказов от вакцинации при проведении противоэпидемиологических мероприятий в домашних очагах. Растет заболеваемость различными вакциноуправляемыми инфекциями и самих медицинских работников. Также остро стоит проблема с предоставлением поддельных прививочных сертификатов и недостоверных све-

дений о проведенной вакцинации или наличии защитного титра антител в крови.

Таким образом, организация прививок требует оптимизации. Изменить ситуацию со своевременностью проведения прививок и достижения необходимого охвата можно с помощью разработки и внедрения автоматизированной системы учета профилактических прививок в РФ, ведь поликлиники зачастую не обладают полными сведениями о привитости детей из организованных коллективов и о прививках, сделанных в частных медицинских клиниках.

Необходимо больше внимания уделять активному просвещению населения в отношении

важности проведения иммунизации и последствий отказа от прививок.

Важным аспектом совершенствования организационно-методических основ иммунопрофилактики в настоящее время является более тщательный контроль над своевременностью проведения вакцинации. Изменить ситуацию поможет оптимизация существующих учетно-отчетных форм, изменение официальных сроков оценки проведения профилактических прививок. Необходимо побороть недостатки в учете проведения вакцинации, что требует создания оптимизированного анализа привитости населения.

Список литературы/References

1. Белов А.Б. Дифтерия: уроки прошлых эпидемий и перспективы контроля эпидемического процесса // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. Т. 66, № 5. С. 12–19. [Belov A.B. Diphtheria: the lessons of past epidemics and the prospects of control of epidemical process. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2012, vol. 66, no. 5, pp. 12–19. (In Russ.)]
2. Белов А.Б., Казаков А.Н. Эпидемиология и профилактика дифтерийной инфекции в войсках (на флоте). Санкт-Петербург: ВМедА, 2000. 76 с. [Belov A.B., Kazakov A.N. Epidemiology and prevention of diphtheria infection in the troops (in the Navy). *St. Petersburg: VMedA*, 2000. 76 p.]
3. Брико Н.И., Фельдблюм И.В. Иммунопрофилактика инфекционных болезней в России: состояние и перспективы совершенствования // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 93, № 2. С. 4–9. [Briko N.I. Feldblyum I.V. Immunoprophylaxis of infectious diseases in Russia: condition and perspective of improvement. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, vol. 93, no. 2, pp. 4–9. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-2-4-9 (In Russ.)]
4. Ильина С.В. О профилактических прививках, инфекционных болезнях и мере ответственности // Педиатрическая фармакология. 2016. Т. 3, № 13. С. 285–288. [Ilyina S.V. Concerning preventive vaccination, infectious diseases and the extent of responsibility. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 285–288. doi: 10.15690/pf.v13i3.1579 (In Russ.)]
5. Кригер Е.А., Самодова О.В., Рогушина Н.Л., Борисова Т.А. Отношение родителей к вакцинации детей и факторы, связанные с отказом от прививок // Педиатрия. 2016. Т. 2, № 95. С. 91–95. [Krieger E.A., Samorodova O.V., Rogushina N.L., Borisova T.A. Parents' attitudes to vaccination of children and factors of vaccinations refuse. *Pediatriya = Russian Pediatrics*, 2016, vol. 2, no. 95, pp. 91–95. (In Russ.)]
6. Лопушов Д.В., Трифонов В.А., Сабаева Ф.Н., Фазулзянова И.М., Шайхразиева Н.Д. Оценка информированности медицинских работников по вопросам нежелательных поствакцинальных явлений // Пермский медицинский журнал. 2017. Т. 34, № 4. С. 82–88. [Lopushov D.V., Trifonov V.A., Sabaeva F.N., Fazulzyanova I.M., Shaikhrazieva N.D. Estimation of medical workers' information level on problems of undesirable postvaccinal phenomena. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2017, vol. 34, no. 4, pp. 82–88. doi: 10.17816/pmj34482-88 (In Russ.)]
7. Максимова Н.М., Маркина С.С., Яцковский К.А., Кошкина Н.А. Развитие эпидемического процесса дифтерии в России в условиях высокого уровня специфического иммунитета // Медицинский альманах. 2009. Т. 7, № 2. С. 105–108. [Maksimova N.M., Markina S.S., Yatskovskiy K.A., Koshkina N.A. Development of diphtheria epidemical process in Russia in conditions of high level of specific immunity. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2009, vol. 7, no. 2, pp. 105–108. (In Russ.)]
8. О внесении изменений и дополнений в Приказ Минздрава России от 27.06.2001 г. № 229 «О Национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям». Приказ Минздрава России от 30.10.2007 г. № 673 от 30.10.2007 г. [On the introduction of changes and additions to the Order of the Ministry of Health of Russia from 27.06.2001. № 229 “On the National immunization schedule and the immunization schedule for epidemic indications”. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation No. 673 of October 30, 2007]
9. О реализации «Программы ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 году» в 2008 году. Письмо Роспотребнадзора № 01/13123-9-23 от 09.09.2009 г. [On the implementation of the “Program for elimination of measles in the Russian Federation by 2010” in 2008. Letter of Rosпотребнадзор № 01/13123-9-23 dated 9.09.2009]
10. Селезнева Т.С., Заргарьянц А.И. Состояние заболеваемости корью на территории Российской Федерации в современных условиях // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. Т. 45, № 2. С. 15. [Selezneva T.S., Zargarjanc A.I. Present-day Measles morbidity rate in the territory of Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2009, vol. 45, no. 2, p. 15. (In Russ.)]
11. Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т., Ежлова Е.Б., Мельникова, Дубовицкая Е.Л., Орлова О.С., Басов А.А., Фролов Р.А. Заболеваемость корью в разных возрастных группах в период элиминации инфекции // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 94, № 3. С. 18–24. [Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Tikhonova N.T., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Dubovitskaya E.L., Orlova O.S., Basov A.A., Frolov R.A. Measles cases by age group during the elimination of infection. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, vol. 94, no. 3, pp. 18–24. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-3-18-25 (In Russ.)]

12. Яковлева Т.В. Вакцинопрофилактика: достижения и проблемы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009. Т. 49, № 6. С. 36–38. [Yakovleva T.V. Vaccine prophylaxis: achievements and problems. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2009, vol. 49, no. 6, pp. 36–38. (In Russ.)]
13. Keegan R., Dabbagh A., Strebel P.M., Cochi S.L. Comparing measles with previous eradication programs: enabling and constraining factors. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 204, pp. 54–61. doi: 10.1093/infdis/jir119
14. Kouadio I.K., Kamigaki T., Oshitani H. Measles outbreaks in displaced populations: a review of transmission, morbidity and mortality associated factors. *BMC Int. Health Hum. Rights*, 2010, vol. 5, no. 10, pp. 1–11. doi: 10.1186/1472-698X-10-5
15. Muscat M. Who gets measles in Europe? *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 204, no. 1, pp. 353–365. doi: 10.1093/infdis/jir067
16. Weekly Epidemiological Record (WER). 29 April 2011, vol. 86, no. 18, pp. 173–176
17. World Health Organization. Immunization coverage, fact sheets, 2018.
18. World Health Organization. Immunization. Vaccines and Biologicals. State of the world's vaccines and immunization. Third edition.
19. World Health Organization. Measles, fact sheets, 2018.
20. World Health Organization. Proceedings of the global technical consultation to assess the feasibility of measles eradication, 28–30 July 2010. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 204, pp. 4–13. doi: 10.1093/infdis/jir100

Авторы:

Галина Н.П., лаборант кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Миндлина А.Я., д.м.н., доцент, профессор кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Полибин Р.В., к.м.н., доцент, доцент кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Galina N.P., Laboratory Assistant, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Mindlina A.Ya., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Polibin R.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.03.2018
Принята к печати 04.03.2019

Received 27.03.2018
Accepted 04.03.2019

АНАЛИЗ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ФОРМИРОВАНИЕ И ТЕЧЕНИЕ КОИНФЕКЦИИ ВИЧ, ТУБЕРКУЛЕЗА И ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА

О.В. Азовцева¹, А.М. Пантелеев², А.В. Карпов¹, Г.С. Архипов¹, В.Р. Вебер¹,
Н.А. Беляков^{2,3}, Е.И. Архипова¹

¹ ФГБОУ ВО Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого, Великий Новгород, Россия

² ФГБУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Настоящий этап ВИЧ-инфекции характеризуется формированием тяжелых и коморбидных форм заболевания, так как, начиная с середины 90-х гг., в эпидемию вошли инъекционные наркопотребители, принесшие в популяцию вирусный гепатит С. По мере развития у больных иммуносупрессии появились оппортунистические и СПИД-индикаторные болезни, включая туберкулез (ТБ). Разные сочетания коинфекций (ВИЧ-инфекция+ТБ±вирусные гепатиты) влияют на клинические проявления и течение болезни, снижают эффективность терапии и ухудшают прогноз заболевания. Цель работы: изучить влияние медико-социальных факторов на течение коинфекции — ТБ на фоне ВИЧ-обусловленной иммуносупрессии и вирусного гепатита. **Материалы и методы.** Проанализированы случаи сочетанной патологии (ВИЧ-инфекции, ТБ и хронических гепатитов), в которых доминирующим диагнозом был ТБ (n = 137). **Результаты.** Среди коинфицированных больных преобладают социально-дезадаптированные молодые люди, имеющие опыт применения внутривенных наркотических веществ и злоупотребляющие алкоголем. Половина коинфицированных больных ранее находились в пенитенциарных учреждениях. Средний уровень CD4-лимфоцитов у больных генерализованным ТБ составил $164 \pm 21,5$ и был значительно ниже уровня CD4-лимфоцитов у больных с легочным процессом. У 73,4% больных, имеющих генерализованный ТБ, наблюдались специфические поражения легких. Развитие генерализованного ТБ начиналось с поражения органов лимфатической системы, затем переходило на другие органы, преимущественно на центральную нервную и мочеполовую системы и органы брюшной полости. Присоединение атиретровирусной терапии к противотуберкулезной терапии в 8 раз снижало летальность. Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями у коинфицированных больных являются вирусные гепатиты. В этиологической структуре превалировал вирусный гепатит С, как в моноформе (86,8%), так и в сочетании с вирусным гепатитом В (9,43%). Наличие вирусных гепатитов приводило к прогрессированию ТБ за счет вовлечения в туберкулезный процесс внутригрудных лимфатических узлов, к развитию оппортунистических заболеваний вследствие выраженного снижения CD4-лимфоцитов. Анализ потенциально отягощающих факторов риска развития гепатотоксичности (вирусные гепатиты, комбинированное лечение

Адрес для переписки:

Азовцева Ольга Владимировна
173000, Россия, Великий Новгород, ул. Большая
Санкт-Петербургская, 41, Новгородский государственный
университет имени Ярослава Мудрого.
Тел.: 8 911 602-50-49 (моб.).
E-mail: olga-azovtseva@mail.ru

Contacts:

Olga V. Azovtseva
173000, Russian Federation, Veliky Novgorod,
Bolshaya Sankt-Peterburgskaja str., 41,
Yaroslav-the-Wise Novgorod State University.
Phone: +7 911 602-50-49 (mobile).
E-mail: olga-azovtseva@mail.ru

Библиографическое описание:

Азовцева О.В., Пантелеев А.М., Карпов А.В., Архипов Г.С., Вебер В.Р.,
Беляков Н.А., Архипова Е.И. Анализ медико-социальных факторов,
влияющих на формирование и течение коинфекции ВИЧ, туберкулеза
и вирусного гепатита // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6.
С. 787–799. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-787-799

Citation:

Azovtseva O.V., Panteleev A.M., Karpov A.V., Arkhipov G.S., Weber V.R.,
Belyakov N.A., Arkhipova E.I. Analysis of medical and social factors
affecting the formation and course of co-infection HIV, tuberculosis and
viral hepatitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 787–799. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-5-6-787-799

противотуберкулезными и антиретровирусными препаратами) не выявил дополнительного негативного их воздействия на функциональное состояние печени у больных. Применение комплексного лечения противотуберкулезными и антиретровирусными препаратами у коинфицированных больных является безопасным и не сопровождается высокой частотой развития гепатотоксических реакций.

Ключевые слова: туберкулез, коинфекция, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, CD4-лимфоциты.

ANALYSIS OF MEDICAL AND SOCIAL FACTORS AFFECTING THE FORMATION AND COURSE OF CO-INFECTION HIV, TUBERCULOSIS AND VIRAL HEPATITIS

Azovtzeva O.V.^a, Pantelev A.M.^b, Karpov A.V.^a, Arkhipov G.S.^a, Weber V.R.^a, Belyakov N.A.^{b,c}, Arkhipov E.I.^a

^a Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, Russian Federation

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

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

Abstract. Currently, HIV infection is characterized by emergence of its severe and comorbid forms. Mid-1990 HIV epidemics was expanded due to injection drug users who brought viral hepatitis C to the cohort. Along with developing immunosuppression, opportunistic and AIDS-defining diseases, including tuberculosis emerged. Various combinations of coinfections (HIV infection+tuberculosis±viral hepatitis) affect clinical manifestations and clinical score, reduce the therapeutic efficacy and worsen disease prognosis. Objective: to study an impact medical and social factors on course of TB-co-infection associated with immunosuppression related to HIV infection and viral hepatitis. *Materials and methods.* Comorbid cases (HIV infection, tuberculosis and chronic hepatitis) dominated by verified TB-infection (n = 137) were analyzed. *Results.* It was shown that socially maladapted young people with previous experience of intravenous drug and alcohol abuse dominated among subjects with co-infections, half of which were held in penal institutions. Moreover, the mean CD4 lymphocyte level in generalized tuberculosis was significantly lower than in patients with significantly reaching 164 ± 21.5 cells. In addition, lung-specific lesions were observed in 73.4% of patients with generalized tuberculosis that developed by initial targeting of the lymphoid system followed by affecting other organs, mainly the central nervous system, urinary system and abdominal organs. Introduction of antiretroviral drugs to anti-TB therapy reduced mortality rate by 8 times. Viral hepatitis was the most common concomitant disease found in co-infected patients, with dominating viral hepatitis C both as a mono-infection (86.8%) as well as in combination with viral hepatitis B (9.43%). In addition, co-morbid viral hepatitis resulted in progression of TB infection affected due to intra-thoracic lymph nodes being involved in tuberculosis process as well as development of opportunistic diseases due to a markedly decreased CD4 cell count. Analysis of potentially aggravating risk factors for developing hepatotoxicity (viral hepatitis, combined treatment with anti-TB and anti-retroviral drugs) did not reveal their any additional negative impact on hepatic functions. Thus, use of a combination therapy with anti-TB and anti-retroviral drugs in co-infected patients was shown to be safe and not accompanied by a high rate of hepatotoxic reactions.

Key words: tuberculosis, coinfection (HIV infection, viral hepatitis), CD4 lymphocytes.

Введение

Настоящий этап ВИЧ-инфекции характеризуется формированием тяжелых и коморбидных форм заболевания, так как, начиная с середины 90-х гг., в эпидемию вошли инъекционные наркомпотребители, принесшие в популяцию вирусный гепатит С [1–3]. По мере развития у больных иммуносупрессии появились оппортунистические и СПИД-индикаторные болезни, включая туберкулез (ТБ) [2, 8]. Заболеваемость ТБ, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, неуклонно увеличивается. Еще в 2016 г. она достигла уровня 9,9 на 100 тыс. населения, что существенно превышало показатели предыдущих лет [16]. ВИЧ-инфекция — мощный фактором риска и активизации ТБ [26], поэтому ТБ является наиболее часто регистрируемым вторичным СПИД-индикаторным инфекционным заболеванием на фоне иммуносупрессии.

Среди коинфицированных больных является большое количество социально-дезадаптированных молодых лиц, вовлекаемых в эпидемический процесс опосредованно через наркоманию, алкоголизм, пребывание в учреждениях пенитенциарной системы [12]. Поэтому среди этих больных большое количество инфицированных дополнительно вирусными гепатитами. Разные сочетания коинфекций изменяют клинические проявления ТБ, снижают эффективность противотуберкулезной терапии и ухудшают его прогноз.

Анализ причин неблагоприятных исходов у больных при ВИЧ-инфекции показал динамику лидирующих причин летальности, где туберкулез в течение последних пятнадцати лет с четвертого места вышел на первое, опередив оппортунистические инфекции, последствия циррозов печени, действие психоактивных средств [4]. Подобная динамика характер-

на для всего пространства Восточной Европы и Центральной Азии с разными климатическими зонами и этносами населения [17].

Цель исследования: изучение влияния медико-социальных факторов на течение коинфекции — ТБ на фоне ВИЧ-обусловленной иммуносупрессии и вирусного гепатита.

Материалы и методы

Проанализированы случаи сочетанной патологии (ВИЧ-инфекции, ТБ и хронических гепатитов), в которых доминирующим диагнозом был ТБ. В исследование включено 137 пациентов, получающих лечение в ГБУЗ «Городская туберкулезная больница № 2» Санкт-Петербурга ($n = 94$) и ГОБУЗ «Новгородский клинический специализированный центр фтизиопульмонологии» Великого Новгорода ($n = 43$) в период с 2016 по 2018 гг.

Всем больным проводилась комплексная оценка клинических проявлений заболевания, рентгенологических изменений по данным обзорной рентгенограммы органов грудной клетки (ОГК) и многосрезовой компьютерной томографии ОГК. Проведено комплексное исследование респираторного и других биологических материалов на наличие микобактерий туберкулеза (МБТ) с использованием микробиологических методов: бактериоскопии, посево в плотные питательные среды (Левенштейна–Йенсена), в жидкую питательную среду с применением анализатора «Bactec MGIT 960», полимеразной цепной реакции (ПЦР) [18].

Диагноз ВИЧ-инфекции подтверждали в иммунном блоттинге при положительных результатах иммуноферментного анализа (ИФА); уровень РНК ВИЧ-1 определяли методом ПЦР; определение количества субпопуляций лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$) — методом проточной цитометрии. Диагностику вирусных гепатитов проводили методом ИФА с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) [2].

Развитие гепатотоксичности на фоне противотуберкулезной терапии оценивали по динамике уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и общего билирубина, которые определяли регулярно на протяжении лечения ТБ в стационаре. Степень гепатотоксических реакций оценивали в соответствии со шкалой нежелательных клинических явлений, предложенной в Федеральных клинических рекомендациях по профилактике, диагностике и лечению ТБ у больных ВИЧ-инфекцией [18].

Исследование соответствует этическим нормам, применимым к ретроспективному анализу, где не освещаются данные по отдельным пациентам.

Статистический анализ проведен в системе Statistica for Windows v.9. Для статистической обработки материала использовали методы описательной статистики на основе анализа абсолютных и относительных величин. При этом количественные данные рассчитывали в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — ошибка среднего. Достоверность различий считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди наблюдаемых больных (ВИЧ+ТБ) большую часть составляли мужчины — 95 человек (69,3%). Средний возраст пациентов составил $37,4 \pm 0,71$ лет. На возрастную группу до 40 лет приходилось 71,5% больных. Доля работающих составила 11,7%. Инвалидность имели 20,4% больных. Туберкулез был выявлен впервые у 76 (55,5%) пациентов.

Половина больных (63 пациента, 45,9%) ранее находились в пенитенциарных учреждениях. У 84 (61,3%) больных имелись данные об употреблении внутривенных наркотиков, причем многие из них оставались активными наркопотребителями. Злоупотребляли алкогольными напитками 97 (70,8%) больных. Контакт с больными ТБ был отмечен у 56 (40,9%) больных. При этом наиболее часто контакт имел место в местах лишения свободы (40 пациентов, 71,4%).

Клиника ТБ зависит от стадии ВИЧ-инфекции. Относительно туберкулезного процесса в течении ВИЧ-инфекции выделяют два периода: период ранней ВИЧ-инфекции, что соответствует 2Б, 3, 4А стадиям (по классификации В.И. Покровского), и период поздней ВИЧ-инфекции, соответствующий 4Б, 4В, 5 стадиям [19].

Из литературных данных известно, что ТБ на ранних стадиях ВИЧ-инфекции протекает с поражением органов дыхания [9, 11]. Туберкулез в этот период представлял собой медленно развивающуюся, склонную к хронизации инфекцию. Единственным патогномичным признаком на ранних стадиях ВИЧ-инфекции являлась высокая частота вовлечения в воспалительный процесс внутригрудных лимфатических узлов (ВГЛУ).

Течение ТБ на поздних стадиях ВИЧ-инфекции характеризуется высокой склонностью к генерализации процесса с поражением как органов дыхания, так и других систем организма, зачастую одновременным [12, 13]. В данной работе изолированное внелегочное поражение наблюдалось крайне редко (9,37%) (табл. 1).

При оценке иммунного статуса у коинфицированных больных (ВИЧ+ТБ) средний уровень $CD4$ -лимфоцитов крови был в 3–4 раза ниже нормы и составил $203 \pm 22,2$ кл/мкл.

Таблица 1. Структура генерализованного ТБ и поражения органов грудной клетки у коинфицированных больных ВИЧ+ТБ (n = 64)

Table 1. Structure of generalized TB and lesions of the chest organs in co-infected patients with HIV+TB (n = 64)

Варианты генерализованного ТБ Generalized TB variants	n	%	
Генерализованный ТБ + туберкулезное поражение легких Generalized TB + tuberculous lesions of the lungs	34	53,1	73,4
Генерализованный ТБ + туберкулезное поражение легких + ВГЛУ Generalized TB + TB lung+ hilar lymph nodes	13	20,3	
Генерализованный ТБ + ВГЛУ Generalized TB + hilar lymph nodes	11	17,2	
Генерализованный ТБ без поражения ОГК Generalized TB without damage to the chest	6	9,37	

Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от выраженности иммуносупрессии. В первую вошли больные с туберкулезным поражением органов грудной клетки (ОГК) (n = 73), во вторую — пациенты с генерализованным туберкулезным процессом (n = 64).

Средний уровень CD4-лимфоцитов в крови у больных с генерализованным ТБ поражением составил $164 \pm 21,5$ кл/мкл (табл. 2) и был достоверно ниже ($p < 0,05$) показателя у больных

Таблица 2. Уровень CD4-лимфоцитов в крови в зависимости от формы туберкулезного процесса (n = 137)

Table 2. The level of CD4 lymphocytes in the blood depending on the form of tuberculosis process (n = 137)

Количество CD4-лимфоцитов, кл/мкл The number of CD4-lymphocytes, cells/ μ l	Генерализованный ТБ Generalized TB (n = 64)	ТБ органов грудной клетки TB of the chest (n = 73)
Среднее количество CD4-лимфоцитов The average number of CD4-lymphocytes	$164 \pm 21,5$	227 ± 22
	$p < 0,05$	
Менее 50, % Less than 50, %	39,1	21,9
51–199, %	26,6	26
200–349, %	18,7	19,2
350–499, %	6,25	19,2
500 и более, % 500 and more, %	9,37	13,7

с легочным процессом — 227 ± 22 кл/мкл, что подтверждает факт генерализации ТБ на фоне подавленного иммунитета при поздних стадиях ВИЧ-инфекции [5, 11, 13, 25].

Следовательно, наблюдается зависимость уровня CD4-лимфоцитов от формы туберкулезного процесса у коинфицированных больных. В 65,7% генерализация туберкулезного процесса происходит при количестве CD4-лимфоцитов в крови менее 200 кл/кл. При критически низком количестве CD4-лимфоцитов (50 кл/мкл и менее) в 2 раза чаще наблюдалось развитие генерализованного ТБ, чем ТБ органов грудной клетки (табл. 2).

На фоне прогрессирующего иммунодефицита ТБ принимает агрессивный характер с генерализацией процесса. Повышенная частота внелегочных локализаций ТБ у больных, инфицированных ВИЧ, объясняется недостаточностью иммунных реакций, не способных сдерживать гематогенную диссеминацию МБТ [5, 25].

В клинической картине у пациентов с генерализованными формами ТБ в 73,4% случаев имелось специфическое поражение легких. Другие сочетания генерализованного ТБ и туберкулезного поражения органов ОГК представлены в таблице 1. Изолированно генерализованный ТБ без поражения ОГК наблюдался в 9,37% случаев.

В 28 (48,3%) случаях у больных помимо ТБ ОГК находили специфический процесс одной внелегочной локализации, в 18 (31%) — поражение двух органов, в семи случаях (12,1%) — трех внелегочных локализаций. В остальных случаях генерализованный ТБ сопровождался множественным органом поражением.

У коинфицированных пациентов достоверно чаще преобладали внелегочные поражения лимфатических узлов [периферических лимфатических узлов (ПЛУ), внутрибрюшных лимфатических узлов (ВБЛУ), забрюшинных лимфатических узлов (ЗБЛУ)], центральной нервной системы (ЦНС), мочеполовой системы (МПС), селезенки, опорно-двигательного аппарата, кишечника, а также печени (рис. 1).

Высокая частота поражения органов лимфатической системы (75%) у больных ТБ, свидетельствует о преобладании лимфогенного этапа генерализации, предшествующего гематогенному (рис. 1).

Поражение ЦНС — наиболее частая и тяжелая для лечения локализация внелегочного ТБ. В работе наблюдалось 15 больных с поражением головного мозга. Доминировала картина менингоэнцефалита (рис. 2). В целом семиотика туберкулезного поражения головного мозга весьма вариабельна в виду способности возбудителя вызывать воспалительный процесс во всех тканевых структурах от сосудистого русла до мозго-

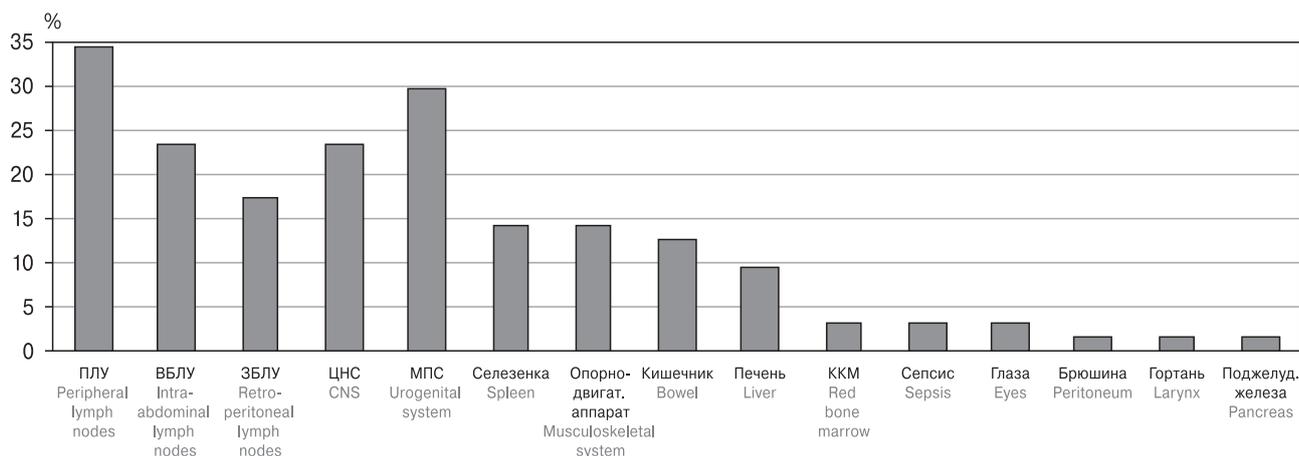


Рисунок 1. Структура внелегочных локализаций ТБ у ВИЧ-инфицированных больных (n = 64)

Figure 1. Structure of extrapulmonary TB localization in HIV-infected patients (n = 64)

вых оболочек и желудочков. Детальное описание радиологических изменений головного мозга и дифференциальной диагностики приведено Т.Н. Трофимовой и соавт. [17].

Отражением тяжести состояния таких пациентов является уровень летальности в этой группе, составляющий 33,3% (ТБ ЦНС наблюдался у 15 пациентов, в том числе у пяти зафиксирован летальных исход). Среднее количество CD4-лимфоцитов в крови составило $165 \pm 50,3$ кл/мкл.

Постановка диагноза ТБ МПС осуществлялась по данным лабораторного скрининга (микроскопическое, бактериологическое, молекулярно-генетическое исследование мочи). Среднее количество CD4-лимфоцитов в крови составило $168 \pm 64,7$ кл/мкл, летальность — 21% (ТБ МПС наблюдался у 19 пациентов, в том числе у четырех с летальным исходом).

Абдоминальный ТБ встречался в 39,1% случаев (у 25 пациентов) и представлял серьезную диагностическую трудность. Поражение селезенки клинически было заподозрено лишь у пяти больных, в других случаях (n = 4) было выявлено при аутопсии. Вовлечение печени клинически было заподозрено лишь у двух больных, в других случаях (n = 4) было выявлено посмертно. Другие варианты абдоминального ТБ (кишечника, брюшины и поджелудочной железы) выявлялись только при аутопсии. Среднее количество CD4-лимфоцитов в крови составило $171 \pm 45,4$ кл/мкл, летальность — 32% (8 пациентов из 25).

Поражения органов опорно-двигательной системы встречались относительно редко и регистрировались только у девяти (14,1%) больных, хотя являлись частой патологией у пациентов без ВИЧ-инфекции [7]. В пяти случаях имели место туберкулезные спондилиты, а у четырех больных было выявлено поражение тазобедренных и коленных суставов. Среднее

количество CD4-лимфоцитов в крови составило $103 \pm 83,4$ кл/мкл, летальность отсутствовала.

Туберкулез красного костного мозга (ККМ) — редкая локализация туберкулезного процесса, которая развивается на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Этот вариант всегда сочетался с тяжелой анемией. Среднее количество CD4-лимфоцитов составляло 42 кл/мкл.

Туберкулез глаз также является очень редкой локализацией туберкулезного процесса, чаще выявляется в виде случайной клинической на-

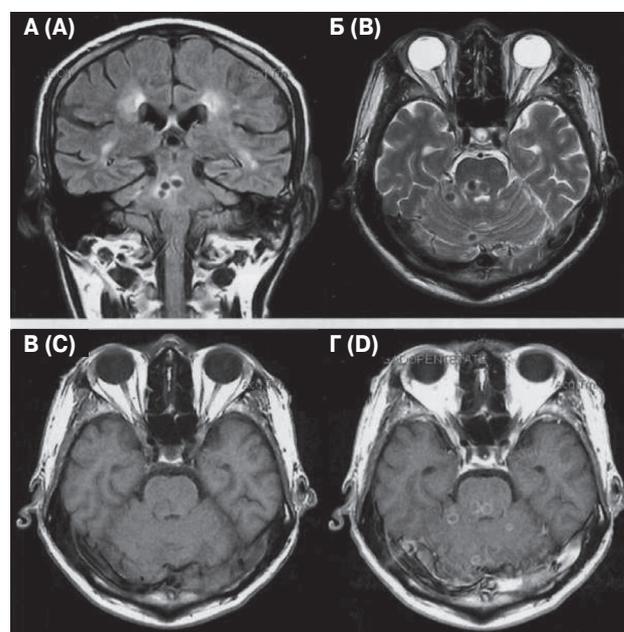


Рисунок 2. Туберкулезный менингоэнцефалит с очагами диссеминации в головном мозге. МРТ: А — T2-FLAIR; Б — T2-ВИ; В — T1-ВИ; Г — T1 после контрастирования [11]

Figure 2. Tuberculous meningoencephalitis with foci of dissemination in the brain. MRI: A — T2-FLAIR; B — T2-VI; C — T1-VI; D — T1 after contrast [11]

Таблица 3. Клиническая характеристика коинфицированных пациентов (ВИЧ+ТБ) (n = 137)

Table 3. Clinical characteristics of co-infected patients (HIV+TB) (n = 137)

	Генерализованный ТБ Generalized TB (n = 64)		ТБ органов грудной клетки Chest TB (n = 73)	
	n	%	n	%
Стадия ВИЧ Stage of HIV				
4А	1	1,56	3	4,11
4Б	10	15,6	54	73,9
4В	53	82,8	16	21,9
Длительность ВИЧ-инфекции The duration of HIV infection				
ВИЧ впервые HIV for the first time	7	10,9	7	9,59
До 1 года Up to 1 year	4	6,25	4	5,48
От 1 до 4 лет From 1 to 4 years	10	15,6	14	19,2
От 5 до 9 лет From 5 to 9 years	19	29,7	27	36,9
Более 10 лет More than 10 years	23	35,9		
CD4-лимфоциты CD4-lymphocytes				
< 50	25	39,1	16	21,9
50–199	17	26,6		
200–349	12	18,7		
350–499	4	6,25	14	19,2
500 и более 500 and more	6	9,37	10	13,7
АРВТ Antiretroviral therapy				
Да/Yes	44	68,7	58	79,4
Нет/No	20	31,2	15	20,5
Сроки назначения АРВТ Terms of antiretroviral therapy				
До ТБ Before TB	19	43,2	21	36,2
После ТБ After TB	25	56,8	37	63,8
Длительность АРВТ Duration of antiretroviral therapy				
< 12 мес. Less than 12 months	25	56,8	42	72,4
От 1 до 4 лет From 1 to 4 years	10	22,7	11	18,9
5 и более лет 5 years or more	9	20,4	5	8,62

ходки, так как не имеет выраженных клинических проявлений. В работе наблюдались 2 случая, которые протекали в виде хореоретинита. Среднее количество CD4-лимфоцитов составляло 459 ± 322 кл/мкл.

Туберкулезный сепсис развивался у пациентов с критически низким уровнем CD4-лимфоцитов (среднее количество CD4-лимфоцитов в крови составляло 42 кл/мкл).

Летальных исходов при ТБ ККМ, ТБ глаз и при туберкулезном сепсисе не наблюдалось.

Чаще всего пациенты с генерализованным ТБ имели 4В стадию заболевания (82,8%). В 68,7% случаев (44 из 64 больных) пациенты получали антиретровирусную терапию (АРВТ) (табл. 3).

Как видно из рисунка 3, генерализованный ТБ развивается у больных с уровнем CD4-лимфоцитов менее 350 кл/мкл. У больных без существенных нарушений иммунного статуса частота генерализованного ТБ составляет 9,37%, в то время как у больных с резким снижением уровня CD4-лимфоцитов его частота возрастает в 4,5 раза, и регистрируется в 39,1% случаев.

В 65,6% случаев ТБ являлся оппортунистической инфекцией и развивался на фоне длительно существующей ВИЧ-инфекции с выраженными проявлениями иммунодефицита. Средняя давность наблюдения по ВИЧ-инфекции ко времени выявления генерализованного ТБ у таких пациентов составляла $6,7 \pm 0,8$ года (табл. 3). Несмотря на большое количество больных, имеющих длительно существующую ВИЧ-инфекцию, антиретровирусную терапию (АРВТ) им начинают проводить после выявления ТБ (56,8%), то есть на поздних стадиях основного заболевания.

Лечение генерализованного ТБ у ВИЧ-инфицированных является сложной проблемой. Показатель летальности ВИЧ-инфицированных с генерализованным ТБ существенно превышает таковой у ВИЧ-инфицированных больных с легочной локализацией туберкулезного процесса (табл. 4).

Однако присоединение к противотуберкулезной терапии АРВТ повышает эффективность лечения. В ходе работы установлено, что на фоне применения АРВТ у больных с генерализованным ТБ летальность снижается в 8 раз.

В диагностике ТБ у пациентов с ВИЧ-инфекцией важным аспектом остается бактериологическая верификация диагноза. Ранее было отмечено, что по мере прогрессирования иммунодефицита уменьшается частота бактериовыделения. Подобная закономерность объяснялась малой склонностью к формированию полостей распада [23]. При этом высказывается мнение, что микроскопия мокроты является нечувствительным методом в диагностике ТБ у больных с ВИЧ-инфекцией [20].

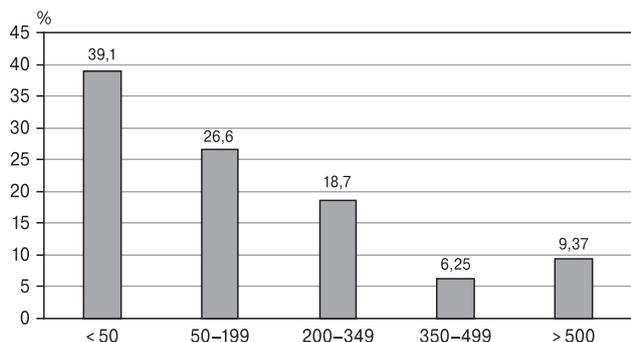


Рисунок 3. Частота внелегочных локализаций ТБ в зависимости от уровня CD4-лимфоцитов (%)

Figure 3. The frequency of extrapulmonary TB localization depending on the level of CD4-lymphocytes (%)

В настоящем исследовании в общей группе больных ($n = 137$) бактериовыделение было выявлено у 85 (62%) больных, что во многом свидетельствует о массивности поражения легочной ткани и степени эпидемической опасности таких больных. Анализ частоты бактериовыделения в зависимости от уровня CD4-лимфоцитов выявил определенные закономерности (рис. 4).

У больных с уровнем CD4-лимфоцитов более 500 кл/мкл бактериовыделение регистрировалось в 7,05% случаев. Возможно, подобный результат связан с малой выборкой пациентов в данной группе. У больных с более низкими значениями CD4-лимфоцитов при выявлении туберкулезного процесса регистрировали повышение частоты бактериовыделения. Однако у больных с наиболее выраженной иммуносупрессией (менее 50 кл/мкл) частота бактериовыделения составила 24,7%. Таким образом, прогрессия ВИЧ-инфекции ведет к возрастанию частоты бактериовыделения у ВИЧ-инфицированных

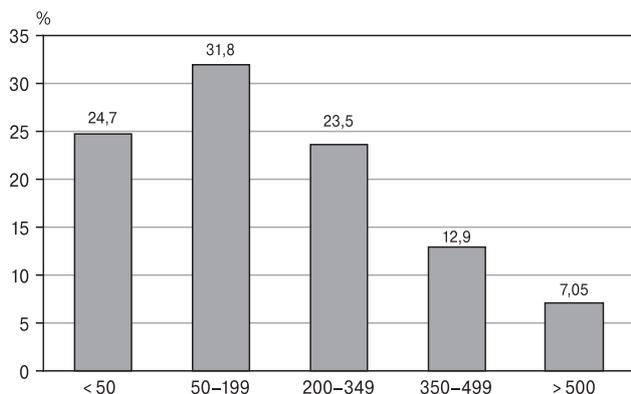


Рисунок 4. Частота бактериовыделения в зависимости от уровня CD4-лимфоцитов у больных ВИЧ+ТБ ($n = 85$)

Figure 4. Frequency of bacteria-discharging depending on the level of CD4-lymphocytes in patients with HIV+TB ($n = 85$)

Таблица 4. Летальность у коинфицированных пациентов ВИЧ+ТБ ($n = 137$)

Table 4. Mortality in coinfecting HIV+TB patients ($n = 137$)

	Генерализованный ТБ Generalized TB ($n = 64$)	ТБ ОГК Chest TB ($n = 73$)
Летальность Mortality	9 (14,1%)	1 (1,37%)
Летальность на АРВТ Mortality in antiretroviral therapy	1 (1,56%)	1 (1,37%)
Летальность без АРВТ Mortality without antiretroviral therapy	8 (12,5)	–

больных ТБ, однако при выраженной иммуносупрессии она вновь снижается.

Важнейшей проблемой отечественной фтизиатрии является нарастание доли больных ТБ с лекарственной устойчивостью (ЛУ) возбудителя. Работами многих исследователей показано, что на фоне ВИЧ-инфекции лекарственная устойчивость МБТ регистрируется с частотой, достигающей чрезвычайно высокого уровня (56,1%) [10]. Множественная ЛУ МБТ регистрировалась у 77 (56,2%) больных с бактериологически подтвержденным ТБ. Частота устойчивости МБТ достоверно не коррелировала с пребыванием больных в местах лишения свободы (49,3% против 50,6%).

При анализе зависимости частоты ЛУ МБТ от количества CD4-лимфоцитов выявлено, что с увеличением иммуносупрессии увеличивается и частота ЛУ МБТ у пациентов ВИЧ+ТБ (рис. 5).

Лекарственная устойчивость МБТ является одной из основных проблем лечения больных с сочетанием ТБ и ВИЧ-инфекции, влияющей

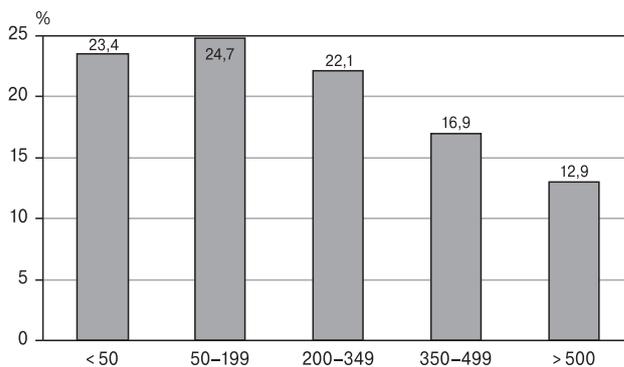


Рисунок 5. Частота лекарственной устойчивости МБТ и степень иммуносупрессии, оцененная по количеству CD4-лимфоцитов в крови у больных ВИЧ+ТБ ($n = 77$)

Figure 5. Hours of MBT drug resistance and the degree of immunosuppression estimated by the number of CD4 lymphocytes in the blood of HIV+TB patients ($n = 77$)

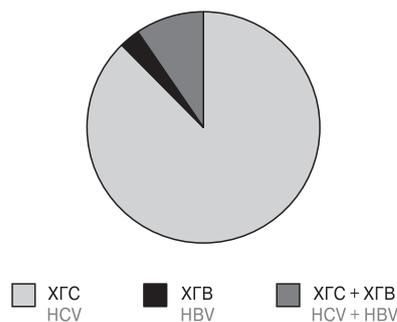


Рисунок 6. Этиологическая структура вирусного гепатита у больных ВИЧ+ТБ (n = 106)

Figure 6. Etiological structure of viral hepatitis in HIV+TB patients (n = 106)

на эффективность и существенно увеличивающей летальность. При проведении корреляционного анализа мы не обнаружили зависимости частоты генерализации ТБ от наличия ЛУ МБТ (46,7% против 53,2% при ТБ легких), а также не обнаружили зависимости частоты летальных исходов заболевания от наличия ЛУ МБТ (6,49% против 8,33% при отсутствии ЛУ МБТ).

Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями являлись вирусные гепатиты (ВГ), которые регистрировались у 106 больных (77,4%). В этиологической структуре ВГ превалировал вирусный гепатит С, как в моноформе (86,8%), так и в сочетании с вирусным гепатитом В (9,43%) (рис. 6).

Широкое распространение гемоконтактных ВГ у коинфицированных больных (ВИЧ+ТБ±ВГ) связано с социальными факторами. К ним относятся высокий уровень употребле-

Таблица 5. Социальные характеристики коинфицированных больных

Table 5. Social characteristics of coinfecting patients

Социальная характеристика Social characteristics	ВИЧ+ТБ+ВГ HIV+TB+viral hepatitis (n = 106)	ВИЧ+ТБ HIV+TB (n = 31)	Общая популяция больных Total population of patients (n = 137)
Возраст Age	37	38,9	37,4
Мужчины Man	72,6%	58,1%	69,3%
Неработающие Non-working	90,6%	80,6%	88,4%
ПИН в анамнеза Injecting drug user	77,3%	12,9%	61,3%
Злоупотребление алкоголем Alcohol misuse	71,7%	67,7%	70,8%
МЛС Convict	53,8%	19,3%	45,9%

ния пациентами наркотиков (77,3%), алкоголя (71,7%) и пребывание в местах заключения (53,8%) (табл. 5). Средний возраст больных с тремя коинфекциями составил 37±4 лет, среди наблюдаемых больных большую часть составляли мужчины 72,6%, удельный вес неработающих пациентов — 90,6% (табл. 5).

Анализ клинико-лабораторных проявлений ТБ у этих больных (ВИЧ+ТБ+ВГ) по сравнению с группой (ВИЧ+ТБ) показал, что клинические проявления были более выраженными у пациентов первой группы (табл. 6).

В группе ВИЧ+ТБ+ВГ в структуре ТБ несколько чаще выявлялось поражение ВГЛУ (табл. 7), наличие оппортунистических заболеваний и более низкое количество CD4-лимфоцитов на момент развития ТБ.

Разница в частоте бактериовыделения между двумя группами недостоверна.

Гемоконтактные ВГ у коинфицированных больных (ВИЧ+ТБ) представляют собой социальную и медицинскую проблему, так как наличие ВГ приводит к прогрессированию ТБ за счет вовлечения в туберкулезный процесс ВГЛУ, к развитию оппортунистических заболеваний вследствие более выраженного снижения CD4-лимфоцитов (табл. 7). Подобные выводы также были получены в ранее опубликованных работах [21].

По данным клинических наблюдений, частота токсического поражения печени при проведении противотуберкулезной терапии составляет от 25 до 80% [14]. Поэтому у многих специалистов возникают опасения в отношении применения противотуберкулезной терапии у ВИЧ-инфицированных, имеющих ВГ в анамнезе, связанные с переносимостью и риска развития нежелательных явлений со стороны печени. Информация по лекарственно-индуцированному поражению печени при проведении противотуберкулезной терапии противоречива.

В 2012 г. Канестри В.Г. и соавт. установили, что «при одновременном лечении ТБ и ВИЧ-инфекции переносимость препаратов значительно хуже, чем при изолированной противотуберкулезной терапии или АРВТ. ...В несколько раз увеличивается частота гепатотоксичности, гипербилирубинемии..., в связи с чем необходимость в замене или отмене препаратов возникает существенно чаще.» [6]. В 2014 г. по данным Мо Р. и соавт., частота гепатотоксических реакций в ходе противотуберкулезной терапии у больных ВИЧ-инфекцией составила 4,2% [22].

В 2016 г. появились работы показывающие, что в 15–30% случаев наблюдалось развитие гепатотоксических реакций, которые проявлялись в повышении уровня печеночных трансаминаз, изменении характеристик печени по результатам ультразвукового исследования [15].

Таблица 6. Структура туберкулезного поражения у коинфицированных больных

Table 6. The structure of tuberculous lesions from coinfected patients

	ТБ органов грудной клетки TB of the chest	Генерализованный ТБ Generalized TB	Летальность Mortality
ВИЧ+ТБ+ВГ (n = 106) HIV+TB+viral hepatitis (n = 106)	52 (49,1%)	54 (50,9%)	7,55%
ВИЧ+ТБ (n = 31) HIV+TB (n = 31)	21 (67,7%)	10 (32,2%)	3,22%

В 2017 г. в работе С. Sekagya-Wiltshire и соавт. отмечено, что связи между концентрациями рифампицина в крови и развитием гепатотоксических реакций в ходе противотуберкулезной терапии у больных ВИЧ-инфекцией установлено не было [24].

Таким образом, изучение вопроса развития гепатотоксичности при использовании противотуберкулезных препаратов в терапии у коинфицированных больных остается актуальным.

В данной работе на старте противотуберкулезной терапии средние значения печеночных ферментов у коинфицированных больных ВИЧ+ТБ±ВГ составили: АЛТ — 37,1±2,6 МЕ/л; АСТ — 32,9±3,8 МЕ/л. На фоне проводимой терапии средние значения постепенно снижались, достигнув к окончанию терапии 32,9±4,1 и 30,2±3,9 МЕ/л для АЛТ и АСТ соответственно (табл. 8).

Уровень билирубина у коинфицированных больных ВИЧ+ТБ±ВГ находился в пределах нормальных значений на всем протяжении терапии, без достоверных его изменений.

Зная о гепатотоксическом действии противотуберкулезных препаратов, предполагалось, что с увеличением сроков приема противотуберкулезных препаратов должна была увеличиться доля больных с гепатотоксичностью. Однако к концу 1 месяца приема противотуберкулезных препаратов было отмечено уменьшение доли больных с отклонением уровня АЛТ от нормы (до 18,9%). В дальнейшем доля больных с повышенным уровнем АЛТ продолжала неуклонно снижаться. К окончанию курса противотуберкулезной терапии частота отклонений АЛТ от нормы была минимальной и составляла 15,3% (табл. 8).

Для уточнения влияния ВГ на развитие гепатотоксичности у коинфицированных больных (ВИЧ+ТБ) при проведении противотуберкулезной терапии, был проведен анализ динамики уровня АЛТ у больных с ВГ и без него. На старте противотуберкулезной терапии у больных с ВГ уровень АЛТ в пределах нормы регистрировался чаще (82,1% против 77,4%, $p > 0,05$). Также отмечалась более низкая регистрация гепатотоксичности I степени (табл. 9). Однако на фоне противотуберкулезной терапии наблюдалась

Таблица 7. Зависимость некоторых клинических характеристик от наличия у коинфицированных ВИЧ+ТБ гемоконтактных вирусных гепатитов

Table 7. Dependence of some clinical characteristics on the presence of hemocontact viral hepatitis in co-infected HIV+TB

	ВИЧ+ТБ+ВГ HIV+TB+viral hepatitis (n = 106)	ВИЧ+ТБ HIV+TB (n = 31)
Бактериовыделение The bacterial excretion	64 (60,4%)	21 (67,7%)
	$p > 0,05$	
Вовлечение ВГЛУ Involvement of intra-thoracic lymph nodes	27 (25,5%)	5 (16,1%)
	$p > 0,05$	
CD4-лимфоциты CD4-lymphocytes	189±22	238±47
	$p > 0,05$	
Опportunистические заболевания Opportunistic disease	17 (16%)	4 (12,9%)
	$p > 0,05$	

Таблица 8. Уровень печеночных ферментов у коинфицированных больных ВИЧ+ТБ±ВГ (n = 137) на фоне противотуберкулезной терапии

Table 8. The level of liver enzymes in co-infected patients with HIV+TB±viral hepatitis (n = 137) on the background of anti-tuberculosis therapy

	АЛТ Alanine aminotransferase		АСТ Aspartate aminotransferase	
	до before	после after	до before	после after
Норма (N) Norm (N)	81%	84,7%	75,2%	80,3%
1,25–2,5 N	15,3%	11,7%	19,7%	16%
2,6–5 N	3,65%	3,65%	4,38%	3,65%
5,1–10 N	–	–	0,73%	–
Более 10 N More than 10 N	–	–	–	–
Среднее значение Average value	37,1±2,6	32,9±4,1	32,9±3,8	30,2±3,9

Таблица 9. Уровень печеночных ферментов у коинфицированных больных ВИЧ+ТБ и ВИЧ+ТБ+ВГ на фоне противотуберкулезной терапии

Table 9. The level of liver enzymes in co-infected patients with HIV+TB and HIV+TB+VH on the background of anti-tuberculosis therapy

	ВИЧ+ТБ HIV+TB (n = 31)		ВИЧ+ТБ+ВГ HIV+TB+viral hepatitis (n = 106)	
	АЛТ Alanine aminotransferase		АЛТ Alanine aminotransferase	
	до before	после after	до before	после after
Норма (N) Norm (N)	77,4%	87,1%	82,1%	83,9%
1,25–2,5 N	19,3%	9,68%	14,1%	12,3%
2,6–5 N	3,22%	3,22%	3,77%	3,87%
5,1–10 N	–	–	–	–
Более 10 N More than 10 N	–	–	–	–

менее выраженная тенденция к восстановлению уровня АЛТ в сравнении с группой больных без ВГ (табл. 9).

Анализ динамики уровня АЛТ показал, что до начала противотуберкулезной терапии у пациентов наблюдались более высокие значения АЛТ (табл. 9). Вероятно, это связано с наличием в печени специфического туберкулезного

воспалительного процесса и/или воздействием токсинов микобактерий и циркулирующих провоспалительных биологически активных веществ. Подтверждением данных предположений может служить снижение АЛТ на фоне противотуберкулезной терапии.

С клинической точки зрения имеет значение развитие гепатотоксичности III–IV степени, при выявлении которой необходимо прерывать лечение и проводить гепатопротективную терапию. Наиболее часто наблюдалось повышение уровня АЛТ, соответствующее I–II степени гепатотоксичности. Данные изменения не являются клинически значимыми и не влияют на тактику лечения ТБ и ВИЧ-инфекции.

Интенсивная лекарственная нагрузка комбинацией противотуберкулезными препаратами и АРВТ считается потенциально рискованной с точки зрения развития гепатотоксичности. В связи с этим проведен сравнительный анализ уровня АЛТ получавших и не получавших АРВТ в период приема противотуберкулезных препаратов.

Уровень АЛТ у больных, получавших комбинированное лечение, был более высоким, чем у больных, принимавших только противотуберкулезные препараты, однако достоверно значения не различались (табл. 10). III и IV степень гепатотоксичности у пациентов, получавших комбинацию противотуберкулезной терапии и АРВТ, за период наблюдения не были зарегистрированы.

Таким образом, анализ потенциально отягощающих факторов риска развития гепато-

Таблица 10. Уровень печеночных ферментов у коинфицированных больных ВИЧ+ТБ и ВИЧ+ТБ+ВГ на фоне противотуберкулезной терапии в зависимости от приема АРВТ

Table 10. The level of liver enzymes in co-infected patients with HIV+TB and HIV+TB+viral hepatitis on the background of anti-tuberculosis therapy, depending on the reception of art

	ВИЧ+ТБ (n = 31) HIV+TB (n = 31)			ВИЧ+ТБ+ВГ (n = 106) HIV+TB+viral hepatitis (n = 106)		
	АЛТ Alanine aminotransferase			АЛТ Alanine aminotransferase		
	до before	АРВТ– antiretroviral therapy– (n = 7)	АРВТ+ antiretroviral therapy+ (n = 24)	до before	АРВТ– antiretroviral therapy– (n = 28)	АРВТ+ antiretroviral therapy+ (n = 78)
		после after	после after		после after	после after
Норма (N) Norm (N)	77,4%	71,4%	91,6%	82,1%	67,8%	84,6%
1,25–2,5 N	19,3%	14,3%	8,33%	14,1%	25%	10,2%
2,6–5 N	3,22%	14,3%	–	3,77%	7,14%	5,13%
5,1–10 N	–	–	–	–	–	–
Более 10 N More than 10 N	–	–	–	–	–	–

токсичности (ВГ, комбинированное лечение противотуберкулезными и антиретровирусными препаратами) не выявил дополнительного негативного их воздействия на функциональное состояние печени у больных. Применение комплексного лечения противотуберкулезными и антиретровирусными препаратами у коинфицированных больных (ВИЧ+ТБ±ВГ) является безопасным и не сопровождается высокой частотой развития гепатотоксических реакций.

Заключение

Среди коинфицированных больных преобладают (88,3%) социально-дезадаптированные молодые лица, имеющие опыт применения внутривенных наркотических веществ (61,3%), злоупотребляющие алкоголем (70,8%). Практически половина коинфицированных больных (45,9%) ранее находилась в пенитенциарных учреждениях. Контакт с больными ТБ был выявлен у 40,9% больных, при этом наиболее часто это происходило в местах лишения свободы.

Средний уровень CD4-лимфоцитов у больных генерализованным ТБ составил $164 \pm 21,5$ кл/мкл и был значительно ниже уровня CD4-лимфоцитов у больных с легочным процессом.

У 73,4% больных, имеющих генерализованный ТБ, наблюдались специфические поражения легких.

У коинфицированных больных в 56,8% случаев АРВТ была начата после выявления туберкулезного процесса, несмотря на то что данные пациенты имели длительный срок ВИЧ-

инфицирования. Этот факт указывает на позднее начало АРВТ.

Лечение генерализованного ТБ у коинфицированных больных является трудно решаемой проблемой. Показатель летальности у больных генерализованной формой туберкулезного процесса существенно превышает данный показатель у больных с легочной локализацией. Присоединение АРВТ к противотуберкулезной терапии в 8 раз снижает летальность в группе генерализованного ТБ.

Прогрессия ВИЧ-инфекции ведет к возрастанию частоты бактериовыделения, однако при выраженной иммуносупрессии (50 и менее клеток) частота бактериовыделения вновь снижается.

Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями у коинфицированных больных являются ВГ. В этиологической структуре преобладает ВГС, как в моноформе (86,8%), так и в сочетании с ВГВ (9,43%). Его наличие приводит к прогрессированию ТБ за счет вовлечения в туберкулезный процесс ВГЛУ, и к развитию оппортунистических заболеваний вследствие выраженного снижения CD4-лимфоцитов.

Анализ потенциально отягощающих факторов риска развития гепатотоксичности (ВГ, комбинированное лечение противотуберкулезными и антиретровирусными препаратами) не выявил дополнительного негативного их воздействия на функциональное состояние печени у больных. Применение комплексного лечения противотуберкулезными и антиретровирусными препаратами у коинфицированных больных является безопасным и не сопровождается высокой частотой развития гепатотоксических реакций.

Список литературы/References

1. Беляков Н.А., Рассохин В.В., Трофимова Т.Н., Степанова Е.В., Пантелеев А.М., Леонова О.Н., Бузунова С.А., Коновалова Н.В., Миличкина А.М., Тотолян А.А. Коморбидные и тяжелые формы ВИЧ-инфекции в России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016. Т. 8, № 3. С. 9–25. [Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Trofimova T.N., Stepanova E.V., Panteleev A.M., Leonova O.N., Buzunova S.A., Konovalova N.V., Milichkina A.M., Totolian A.A. Comorbid and severe forms of HIV infection in Russia. *VICH-infekcija i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppression*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 9–25. doi: 10.22328/2077-9828-2016-8-3-9-25 (In Russ.)]
2. Вирус иммунодефицита человека — медицина / Под ред. Н.А. Белякова, А.Г. Рахмановой. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. 752 с. [Human immunodeficiency virus-medicine. Ed. by N.A. Belyakov, A.G. Rakhmanova. *SPb.: Baltic Medical Educational Center*, 2010. 752 p. (In Russ.)]
3. ВИЧ-инфекция, вторичные и сопутствующие заболевания: Медицинский тематический архив. Под ред. Н.А. Белякова, В.В. Рассохина, Е.В. Степановой. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2014. № 8. 368 с. [HIV infection, secondary and concomitant diseases: medical thematic archive. Ed. by N.A. Belyakov, V.V. Rassokhin, E.V. Stepanova. *SPb.: Baltic Medical Educational Center*, 2014, no. 8. 368 p. (In Russ.)]
4. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2018 г. (справка). М.: Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2018. [HIV infection in the Russian Federation in 2018 (reference). Moscow: *Federal Scientific and Methodological Center for Prevention and Control of AIDS of the Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор*, 2018. (In Russ.)]
5. Зюзя Ю.Р., Пархоменко Ю.Г., Зимина В.Н., Флигиль Д.М. Сочетанные ВИЧ-ассоциированные инфекции легких — особенности морфологической верификации и дифференциальной диагностики // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. Т. 1, № 1. С. 21–25. [Zyuzya Yu.R., Parkhomenko Yu.G., Zimina V.N., Fligil D.M. Combined HIV-associated lung infections — features of morphological verification and differential diagnosis. *Klinicheskaja i jeksperimental'naja morfologija = Clinical and Experimental Morphology*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 21–25. (In Russ.)]

6. Канестри В.Г., Зими́на В.Н., Кравченко А.В., Батыров Ф.А., Попова А.А., Васильева И.А. Сочетанная терапия ВИЧ-инфекции и туберкулеза: анализ безопасности и переносимости // Инфекционные болезни. 2012. Т. 10, № 3. С. 5–9. [Kanestri V.G., Zimina V.N., Kravchenko A.V., Batyrov F.A., Popov A.A., Vasilyeva I.A. Concomitant treatment of HIV and tuberculosis: analysis of safety and tolerability. *Infekcionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2012, vol. 10, no. 3, pp. 5–9. (In Russ.)]
7. Картавых А.А., Борисов С.Е., Матвеева М.В., Белиловский Е.М. Туберкулез внелегочных локализаций по данным персональных регистров впервые выявленных больных // Туберкулез и болезни легких. 2009. № 10. С. 17–26. [Kartavykh A.A., Borisov S.E., Matveeva M.V., Belilovsky E.M. Tuberculosis of extrapulmonary localizations according to personal registers of the first revealed patients. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Disease*, 2009, no. 10, pp. 17–26. (In Russ.)]
8. Леонова О.Н., Степанова Е.В., Беляков Н.А. Тяжелые и коморбидные состояния у больных с ВИЧ-инфекцией: анализ неблагоприятных исходов // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1. С. 55–64. [Leonova O.N., Stepanova E.V., Belyakov N.A. Severe and comorbid conditions in patients with HIV infection: analysis of adverse outcomes. *VICH-infekcija i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppression*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 55–64. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-55-64 (In Russ.)]
9. Нечаев В.В., Иванов А.К., Пантелеев А.М. Социально-значимые инфекции: Монография; в 2-х частях. Часть. 2. СПб.: ООО «Береста», 2011. 320 с. [Nechaev V.V., Ivanov A.K., Panteleev M.A. Socially significant infections: Monograph in 2 parts. Part 2. *St. Petersburg: LLC "Beresta", 2011. 320 p. (In Russ.)]*
10. Пантелеев А.М. Бактериовыделение и лекарственная устойчивость МБТ при туберкулезе у ВИЧ-инфицированных людей в Санкт-Петербурге // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011. Т. 3, № 2. С. 57–61. [Panteleev A.M. Bacterial release and drug resistance of MBT in tuberculosis in HIV-infected people in St. Petersburg. *VICH-infekcija i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppression*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 57–61. (In Russ.)]
11. Пантелеев А.М. Туберкулез органов дыхания у больных с ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2010. Т. 2, № 1. С. 16–22. [Panteleev A.M. Respiratory tuberculosis in patients with HIV infection. *VICH-infekcija i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppression*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 16–22. (In Russ.)]
12. Пантелеев А.М., Савина Т.А., Супрун Т.Ю. Внелегочный туберкулез у ВИЧ-инфицированных // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007. Т. 84, № 7. С. 16–19. [Panteleev A.M., Savina T.A., Suprun T.Y. Extrapulmonary tuberculosis in HIV-infected persons. *Problemy tuberkuleza i boleznej legkih = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2007, vol. 84, no. 7, pp. 16–19. (In Russ.)]
13. Скопин М.С., Батыров Ф.А., Корнилова З.Х. Распространенность туберкулеза органов брюшной полости и особенности его выявления // Проблемы туберкулеза, 2007, Т. 84, № 1. С. 22–26. [Skopin M.S., Batyrov F.A., Kornilova Z.Kh. Prevalence of tuberculosis of the abdominal cavity and features of its detection. *Problemy tuberkuleza = Problems of tuberculosis*, 2007, vol. 84, no. 1, pp. 22–26. (In Russ.)]
14. Степанова Н.А., Стрельцова Е.Н., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Нежелательные побочные реакции на противотуберкулезные препараты основного ряда // Туберкулез и болезни легких. 2016. Т. 94, № 5. С. 42–45. [Stepanova N.A., Streltsova E.N., Galimzyanov H.M., Kantemirova B.I. Undesirable adverse reactions to anti-tuberculosis drugs of the main series. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Disease*, 2016, vol. 94, no. 5, pp. 42–45. doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-5-42-45 (In Russ.)]
15. Сукач М.Н. Факторы риска гепатотоксичности при проведении противотуберкулезного лечения у больных, коинфицированных ВИЧ и хроническим гепатитом С // Клиническая инфектология и паразитология. 2016. № 4. С. 449–458. [Sukach M.N. Risk factors of hepatotoxicity during TB treatment in patients coinfecting with HIV and chronic hepatitis C. *Klinicheskaja infektologija i parazitologija = Clinical Infectology and Parasitology*, 2016, no. 4, pp. 449–458. (In Russ.)]
16. ТБ/ВИЧ в Российской Федерации. Эпидемиология, особенности клинических проявлений и результаты лечения. Под ред. С.А. Стерликова. М.: РИО ЦНИИОИЗ, 2017. 52 с. [TB/HIV in the Russian Federation. Epidemiology, clinical manifestations and results of treatment. Ed. by S.A. Sterlikova. *Moscow: Central Research Institute of Organization and Reformatization of Health*, 2017. 52 p. (In Russ.)]
17. Трофимова Т.Н., Беляков Н.А., Рассохин В.В. Радиология и ВИЧ-инфекция. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2017. 352 с. [Trofimova T.N., Belyakov N.A., Rassokhin V.V. Radiology and HIV infection. *St. Petersburg: Baltic Medical Education Center*, 2017. 352 p. (In Russ.)]
18. Федеральные клинические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. М.: Российское общество фтизиатров, 2016. 42 с. [Federal clinical recommendations for the prevention, diagnosis and treatment of tuberculosis in patients with HIV infection. *Moscow: Russian Society of Phthisiologists*, 2016. 42 p. (In Russ.)]
19. Фролова О.П., Кравченко А.В., Юрин О.Г. Определение стадии ВИЧ-инфекции у больных туберкулезом // Инфекционные болезни. 2009. № 4. С. 70–74. [Frolova O. P., Kravchenko A. V., Yurin O. G. determination of the stage of HIV infection in patients with tuberculosis. *Infekcionnye bolezni = Infectious Disease*, 2009, no. 4, pp. 70–74. (In Russ.)]
20. Hassim S., Shaw P.A., Sangweni P., Malan L., Ntshani E., Mathibedi M.J., Stubbs N., Metcalf J.A., Eckes R., Masur H., Komati S. Detection of a substantial rate of multidrug-resistant tuberculosis in an HIV- infected population in South Africa by active monitoring of sputum samples. *Clin. Inf. Dis.*, 2010, vol. 50, iss. 7, pp. 1053–1059. doi: 10.1086/651119
21. Marks K.M., Petrovic L.M., Talal A.N., Murray M.P., Gulick R.M., Glesby M.J. Histological Findings and clinical characteristics associated with Hepatic steatosis in Patients coinfecting with HIV and Hepatitis C viruses. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 192, no. 11, pp. 1943–1949.
22. Mo P., Zhu Q., Teter C., Yang R., Deng L., Yan Y., Chen J., Zeng J., Gui X. Prevalence, drug-induced hepatotoxicity, and mortality among patients multi-infected with HIV, tuberculosis, and hepatitis virus. *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 28, pp. 95–100. doi: 10.1016/j.ijid.2014.06.020
23. Ngowi B.J., Mfinanga S.G., Bruun J.N., Morkve O. Pulmonary tuberculosis among people living with HIV/AIDS attending care and treatment in rural northern Tanzania. *BMC Public Health*, 2008, vol. 30, no. 8: 341. doi: 10.1186/1471-2458-8-341

24. Sekagya-Wiltshire C., von Braun A., Scherrer A.U., Manabe Y.C., Buzibye A., Muller D., Ledergerber B., Gutteck U., Corti N., Kambugu A., Byakika-Kibwika P., Lamorde M., Castelnovo B., Fehr J., Kanya M.R. Anti-TB drug concentrations and drug-associated toxicities among TB/HIV-coinfected patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017, vol. 72, iss. 4, pp. 1172–1177. doi: 10.1093/jac/dkw534
25. Sharma S.K., Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, 2004, vol. 120, pp. 316–353.
26. Toosi Z., Wu M., Islam N., Teixeira-Johnson L., Heal R., Aung H. Transactivation of human immunodeficiency virus-1 in T-cells by Mycobacterium tuberculosis-infected mononuclear phagocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, 2004, vol. 144, pp. 108–115.

Авторы:

Азовцева О.В., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого, Великий Новгород, Россия;

Пантелеев А.М., д.м.н., профессор кафедры социально значимых инфекций ФГБУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Карпов А.В., д.м.н., профессор кафедры специализированной терапии ФГБОУ ВО Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого, Великий Новгород, Россия;

Архипов Г.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого, Великий Новгород, Россия;

Вебер В.Р., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой внутренних болезней ФГБОУ ВО Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого, Великий Новгород, Россия;

Беляков Н.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой социально значимых инфекций ФГБУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; руководитель Северо-Западного Окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Архипова Е.И., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, иммунологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого, Великий Новгород, Россия.

Authors:

Azovtseva O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, Russian Federation;

Panteleev A.M., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Socially Significant Infections Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Karpov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Specialized Therapy of the Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, Russian Federation;

Arkhipov G.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases of the Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, Russian Federation;

Veber V.R., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Internal Diseases of the Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, Russian Federation;

Belyakov N.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Socially Significant Infections, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Northwest Regional AIDS Prevention and Control Centre, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Arkhipova E.I., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases of the Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, Russian Federation.

ЗНАЧЕНИЕ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ЭНДОГЕННЫМИ УВЕИТАМИ

М.С. Петровская, Г.И. Кричевская, Е.В. Денисова, Л.А. Катаргина, И.Г. Куликова

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Эндогенные увеиты (ЭУ) у детей — многофакторное заболевание, угрожающее зрительным функциям глаза и снижающее качество жизни пациента. Пролиферативный синдром (ПС) с развитием спаек, помутнений стекловидного тела, эпиретинальных и преретинальных мембран — одно из наиболее тяжелых осложнений ЭУ, его патогенез не ясен. Среди многочисленных триггерных факторов предполагается роль инфекций, в частности вирусов группы герпеса человека. Цель — определить возможную роль Herpes simplex viruses type 1 (HSV-1), Herpes simplex viruses type 2 (HSV-2), Epstein–Barr virus (EBV) и Cytomegalovirus (CMV) в патогенезе ПС у детей с эндогенными увеитами. Обследовано 112 пациентов в возрасте от 3 до 17 лет (средний возраст 10 лет) с наличием явлений пролиферации разной степени выраженности (93 пациента) и без них (19 детей). В иммуноферментном анализе выявляли IgM, IgG-антитела (маркеры хронической и активной инфекции) к HSV-1/2, EBV и CMV. Достоверное повышение частоты ПС в группе инфицированных по сравнению с неинфицированными детьми выявлено только при EBV-инфекции ($p = 0,03$) и не отмечено при инфекциях, вызванных HSV-1/2 ($p > 0,05$) и CMV ($p > 0,05$). Однако возникновение ПС у пациентов, не инфицированных EBV, указывает на наличие и других факторов, способствующих пролиферации при интраокулярном воспалении. У 28 детей одновременно в сыворотке крови в рамках мультиплексного анализа определяли содержание IL-8 и IL-6. IL-8 выявлен в сыворотках всех обследованных, при этом наблюдались большие колебания его индивидуальных уровней (5,6–2743 пг/мл). Отмечена тенденция к усилению системной продукции IL-8 у пациентов с более интенсивными явлениями пролиферации и наличием серологических маркеров реактивации EBV. IL-6 в сыворотке крови обнаружен почти в 2 раза реже IL-8 — у 55% обследованных (разброс индивидуальных показателей 1,3–35,5 пг/мл). Корреляции между степенью выраженности пролиферативного синдрома, активностью EBV-инфекции и системным уровнем IL-6 не установлено. Необходимы дальнейшие исследования для оценки роли EBV в патогенезе пролиферативного синдрома при эндогенных увеитах у детей, так как подтверждение выявленных тенденций может служить обоснованием для включения в комплексную терапию противогерпетических препаратов.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, увеит, пролиферативный синдром, IL-6, IL-8.

Адрес для переписки:

Кричевская Галина Исааковна
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19,
ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 624-57-13 (служебн.); 8 985 191-92-34 (моб.).
E-mail: gkri@yandex.ru

Contacts:

Galina I. Krichevskaya
105062, Russian Federation, Moscow,
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19,
Helmholtz National Medical Research Centre of Eye Diseases.
Phone: +7 (495) 624-57-13 (office); +7 985 191-92-34 (mobile).
E-mail: gkri@yandex.ru

Библиографическое описание:

Петровская М.С., Кричевская Г.И., Денисова Е.В., Катаргина Л.А.,
Куликова И.Г. Значение вируса Эпштейна–Барр в патогенезе
пролиферативных осложнений у детей с эндогенными
увеитами // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 800–804.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-800-804

Citation:

Petrovskaya M.S., Krichevskaya G.I., Denisova E.V., Katargina L.A.,
Kulikova I.G. Importance of Epstein–Barr virus infection in pathogenesis
of proliferative complications in children with endogenous uveitis // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 5–6, pp. 800–804. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-800-804

IMPORTANCE OF EPSTEIN–BARR VIRUS INFECTION IN PATHOGENESIS OF PROLIFERATIVE COMPLICATIONS IN CHILDREN WITH ENDOGENOUS UVEITIS

Petrovskaya M.S., Krichevskaya G.I., Denisova E.V., Katargina L.A., Kulikova I.G.

Helmholtz National Medical Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. Endogenous uveitis (EU) in children is a multifactorial sight-threatening disease that reduces patient's quality of life. Proliferative syndrome (PS) coupled to developing adhesions, opacity of vitreous body, epiretinal and preretinal membranes is one of the most serious EU complications, with yet-unknown pathogenesis. Among the numerous trigger factors, a role for infections, particularly human herpes group-driven, is proposed. The goal of the study was to assess a potential role of Herpes simplex viruses type 1 (HSV-1), Herpes simplex viruses type 2 (HSV-2), Epstein–Barr virus (EBV) and Cytomegalovirus (CMV) played in the PS pathogenesis in children with endogenous uveitis. 112 patients aged 3–17 years (mean age 10 years) with (93 patients)/without PS (19 children) were examined. IgM and IgG antibodies (markers of chronic and active infection) against HSV-1/2, EBV and CMV were detected by ELISA. A significantly increased PS rate in infected vs. uninfected children was revealed solely for EBV infection ($p = 0.03$), but not for HSV-1/2 ($p > 0.05$) or CMV-positive patients ($p > 0.05$). However, PS emergence in EBV-negative patients also suggests that some factors might contribute to proliferation in intraocular inflammation. In addition, level of serum IL-8 and IL-6 were assessed by multiplex analysis in 28 children. It was found that IL-8 was detected in all patients, with great individual fluctuations (5.6–2743 pg/ml). Enhanced systemic IL-8 level tended to rise in patients with more prominent proliferation and serological markers of EBV reactivation. However, serum IL-6 was detected by about 2-fold less often reaching up to 55% cases (variation of individual indices 1.3–35.5 pg/ml). A correlation between PS severity, EBV infection activity and systemic IL-6 level was not observed. Further studies evaluating a role of EBV infection in PS pathogenesis pediatric endogenous uveitis are necessary, as it may underlie a rationale for including antiherpetic drugs into a combination therapy.

Key words: Epstein–Barr virus, uveitis, proliferative syndrome, IL-6, IL-8.

Эндогенные увеиты (ЭУ), воспалительные заболевания сосудистой (увеальной) оболочки глаза, отличаются по этиологии, патогенезу, локализации воспалительного процесса (передние, средние, задние, панувеиты) и клиническому течению. Их медико-социальная значимость обусловлена склонностью к генерализации, высокой частотой хронических и рецидивирующих форм [3].

Пролиферативный синдром (ПС) независимо от вызвавшей его причины (травма, диабет, увеит и др.) возникает после нарушения целостности гематофтальмического барьера и последующего интраокулярного воспаления [1, 7]. ПС одно из проявлений тяжелого осложненного течения ЭУ. Для передних увеитов характерно развитие синехий: передних (спайки радужной оболочки глаза с роговицей) и задних (спайки радужки с хрусталиком), зарращение зрачка. При задних увеитах формируются фиброзные тяжи в стекловидном теле, пре- и эпиретинальные мембраны, что может привести к тракционной отслойке сетчатки. Пролиферативные осложнения существенно ухудшают зрительные функции и качество жизни пациента.

В основе ПС лежит пролиферация клеток пигментного эпителия сетчатки при задних ЭУ или эндотелия роговицы и беспигментного эпителия цилиарного тела при передних [5].

В реализации интраокулярного воспаления в качестве клеток-мишеней или клеток-продуцентов цитокинов участвуют также глиальные

клетки, макрофаги, нейтрофилы, фибробласты. Имеются сообщения, что при травматической витреоретинопатии воспаление обусловлено IL-1, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF α [1, 2, 4].

Роль IL-6 и IL-8 в интраокулярном воспалении связывают с их способностью вызывать пролиферацию, дифференциацию и активацию клеток. IL-8, основной хемоаттрактант для нейтрофилов, продуцируется, главным образом, клетками пигментного эпителия сетчатки, макрофагами, эндотелиальными клетками. Системное (в сыворотке) и особенно локальное (в стекловидном теле и влаге передней камеры глаза) повышение уровня IL-8 по сравнению с контрольной группой отмечено у взрослых пациентов с витреоретинопатией разного генеза (диабетической, посттравматической и пролиферативной). В отличие от IL-8, IL-6 повышался лишь во внутриглазных жидкостях [6]. Обнаружена связь между увеличением концентрации IL-8 и IL-6 во влаге передней камеры глаза и выраженностью ПС у детей с ЭУ [2].

Некоторые Human herpes viruses (HHV) способны индуцировать синтез провоспалительных цитокинов, в частности IL-8, что обеспечивает инфицированным клеткам уклонение от иммунного надзора, нарушение апоптоза, усиление пролиферативных функций [8].

Полученные нами ранее результаты позволили предположить влияние хронических герпетических инфекций и их реактивации на формирование пролиферативных осложнений при ЭУ у детей [4].

В данной статье представлены результаты дальнейшего изучения влияния некоторых HHV на развитие ПС при ЭУ у детей.

Материалы и методы

Обследовано 112 детей в возрасте от 3 до 17 лет (в среднем 10 лет) с ЭУ разного генеза и локализации. Всем пациентам проведено тщательное офтальмологическое обследование.

Сыворотки крови исследовали в иммуноферментном анализе (автоматический ИФА-анализатор «Лазурит», США) с тест-системами производства АО «Вектор-Бест» (Россия). Определяли антитела к распространенным офтальмотропным возбудителям: Herpes simplex viruses 1 и 2 (HSV-1, HSV-2) (ВектоВПГ-IgM, ВектоВПГ-1,2-IgG); Cytomegalovirus (CMV) (Векто ЦМВ-IgM, ВектоЦМВ-IgG); Epstein-Barr virus (EBV) (ВектоВЭБ-VCA-IgM, ВектоВЭБ-NA-IgG, ВектоВЭБ-EA-IgG); *Toxoplasma gondii* (Векто-Токс-IgG); *Toxocara canis* (Токсокара-IgG-ИФА-Бест); *Chlamydia trachomatis* (ХламиБест С. trachomatis-IgM, ХламиБест С. trachomatis-IgG, ХламиБест С. trachomatis-IgA). Для выявления IgG-антител к предранним белкам HSV-1/2 и CMV (серологические маркеры реактивации вирусов) использовали тест-системы БиоСет-актив-ВПГ, БиоСет-актив-ЦМВ (ЗАО БТК «Биосервис», Россия).

Постановку ИФА выполняли в соответствии с инструкциями производителя.

В сыворотке крови 28 детей в рамках мультиплексного анализа определяли содержание IL-6, IL-8 на проточном цитофлуориметре «BD FACS Canto II» (Becton Dickinson, США), наборами «CBA Th1/Th2 Cytokines MultiplexKit» (BD Biosciences, США); данные обрабатывали в программе «FCAP Array» (SoftFlow, США).

Статистическая обработка: программа «BIOSTADT», метод χ^2 , точный критерий Фишера, t-критерий Стьюдента. Определяли частоту выявления признака, среднее значение (M), стандартное отклонение от среднего (Σ), медиану.

Результаты и обсуждение

Выделили 2 группы детей с ЭУ: 1 группа — 19 детей без клинических симптомов ПС; 2 группа — 93 пациента с ПС 1, 2 и 3 стадии (согласно предложенной Е.В. Денисовой классификации ПС, в зависимости от его распространенности и интенсивности) [2].

Обе группы были сравнимы по возрастному составу. Серологические исследования показали, что инфицированность *T. gondii* (6.6%), *T. canis* (1.3%), *C. trachomatis* (6.5%) встречалась значительно реже, чем HSV-1/2 (55.4%), CMV (69.6%) и EBV (78.6%) поэтому дальнейший анализ проводили только в отношении герпесвирусов (табл.).

Уровень серопозитивности к HSV-1/2 и CMV в обеих группах существенно не отличался. У детей с явлениями пролиферации по сравнению с детьми без ПС инфицированность EBV была достоверно выше ($p = 0,03$).

Сыворотки крови 28 из 112 детей одновременно исследовали на антитела к HSV-1/2, CMV, EBV и IL-6, IL-8. IL-8 обнаружен в крови всех обследованных, независимо от наличия и активности EBV-инфекции и стадии ПС. В связи с большим разбросом индивидуальных уровней IL-8 (31–466 пг/мл у серонегативных к EBV детей; 5,6–19349 пг/мл у инфицированных детей без реактивации вируса и 115–2143 пг/мл в группе с реактивацией вируса) в качестве признака, характеризующего продукцию IL-8 в изучаемых группах детей, выбрали медиану. Наиболее низкие средние показатели концентрации IL-8 в крови обнаружены у EBV-серонегативных детей (ПС 1 стадия — 31,1 пг/мл, 3 стадия — 63 пг/мл). У EBV-серопозитивных детей наблюдалась тенденция к повышению системной продукции IL-8 (медиана) по мере усиления явлений пролиферации, однако сохранялись выраженные различия в индивидуальных показателях этого цитокина (рис.).

В пределах одной стадии ПС (1 и 3) средние уровни сывороточного IL-8 повышались у детей с серологическими маркерами реактивации EBV

Таблица. Частота инфицированности Human herpes viruses детей с увеитами с наличием и отсутствием пролиферативного синдрома

Table. The frequency of infection with Human herpes viruses in children with or without of proliferative syndrome

Группа Group	Обследовано (n) Examined (n)	Антитела Antibodies		
		HSV-1,2-IgG	CMV-IgG	EBV NA-IgG
1 — без ПС* 1 — without of PS*	19	10	11	11
2 — с ПС 2 — with PS	93	52	69	78
P**		= 0,97	= 0,28	= 0,033

Примечание. *ПС — пролиферативный синдром; **статистическая значимость различий между I и II группой.

Note. *PS — proliferative syndrome; **statistical significance of differences between I and II groups.

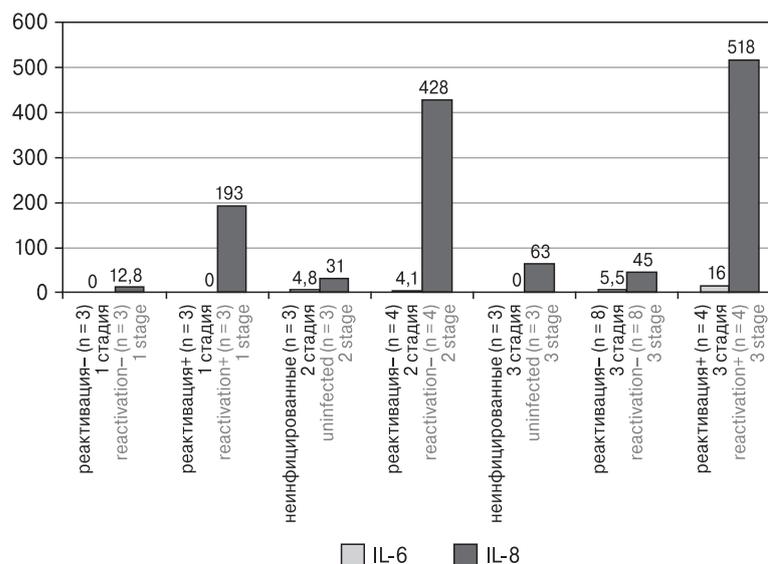


Рисунок. Уровни IL-6 и IL-8 (медиана) в сыворотках детей с ЭУ и различными стадиями ПС в зависимости от наличия и реактивации EBV-инфекции

Figure. Levels of serum IL-6, IL-8 (median) in children with EU and different stages of PS depending on EBV-infection and it reactivation

Примечание. *Серологические маркеры реактивации ВЭБ не выявлены; **серологические маркеры реактивации ВЭБ выявлены.

Note. *Serological markers of EBV- reactivation is not detected; **serological markers of reactivation of EBV revealed.

в сравнении с показателями неинфицированных детей или детей с хронической EBV-инфекцией. Однако сравнительно высокий системный уровень IL-8 отмечен также у хронически инфицированных, но без серологических маркеров реактивации ВЭБ детей с ПС 2 стадии, что согласуется с современным представлением об иммуномодулирующем действии не только литических, но и латентных генов этого вируса (рис.) [8].

Развитие ПС у пациентов, не инфицированных ВЭБ, указывает на наличие и других факторов, способствующих пролиферации при интраокулярном воспалении. Значительные колебания в индивидуальных уровнях IL-8 в сыворотке могут объясняться не только особенностями обследованных пациентов, но и характером назначаемой им терапии, нередко включающей иммуностимулирующие препараты различного действия.

IL-6 выявлен у 55% детей, почти в 2 раза реже по сравнению с IL-8. Мы не обнаружили существенного отличия в концентрации IL-6 в сыворотке крови при разных стадиях ПС, хотя

наблюдалась тенденция к увеличению частоты выявления и среднего уровня IL-6 в крови по мере нарастания степени ПС: у 6 пациентов с ЭУ и 1 стадией ПС IL-6 в сыворотке выявить не удалось, а при 3 стадии был обнаружен у 8 из 12 обследованных в концентрациях 1,22–25,6 пг/мл. По нашим данным у взрослых пациентов с пролиферативной витреоретинопатией наблюдается преимущественно локальный интраокулярный синтез IL-6 [4].

Таким образом, обнаружено статистически достоверное повышение частоты развития ПС у детей с ЭУ, инфицированными EBV, но не HSV и CMV. Отмечена тенденция к усилению системной продукции провоспалительного цитокина хемокина IL-8 у детей с более развитыми стадиями ПС и серологическими маркерами реактивации хронической EBV-инфекции. Необходимы дальнейшие исследования для накопления большего числа наблюдений, так как подтверждение выявленных тенденций может служить обоснованием для включения в комплексную терапию противогерпетических препаратов.

Список литературы/References

1. Артемьева О.В., Самойлов А.Н., Жернаков С.В. Проллиферативная витреоретинопатия: современные представления об этиологии и патогенезе // Вестник офтальмологии. 2014. № 3. С. 67–71. [Artemyeva O.V., Samoilov A.N., Zhernakov S.V. Proliferative vitreoretinopathy: modern view on etiology and pathogenesis. *Vestnik oftal'mologii = The Russian Annals of Ophthalmology*, 2014, no. 3, pp. 67–71. (In Russ.)]
2. Денисова Е.В., Слепова О.С., Катаргина Л.А., Петровская М.С., Куликова И.Г. Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в патогенезе пролиферативных осложнений у детей с эндогенными увеитами. Российский офтальмологический журнал. 2015. Т. 8, № 3. С. 5–9. [Denisova E.V., Slepova O.S., Katargina L.A., Petrovskaya M.S.,

- Kulikova I.G. Cytokines in aqueous humor and their role in the pathogenesis of proliferative complications in children with endogenous uveitis. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2015, vol. 8, no. 3, pp. 5–9. (In Russ.)
3. Катаргина Л.А., Хватова А.В. Эндогенные увеиты у детей и подростков. М., Медицина, 2000. 320 с. [Katargina L.A., Khatova A.V. Endogenous uveitis in children and adolescents. Moscow: Medicine, 2000. 320 p. (In Russ.)]
 4. Петровская М.С., Денисова Е.В., Слепова О.С., Катаргина Л.А. Роль инфекционных факторов в развитии пролиферативного синдрома при эндогенных увеитах у детей // Российская педиатрическая офтальмология. 2012. № 2. С. 28–31. [Petrovskaya M.S., Denisova E.V., Slepova O.S., Katargina L.A. The role of infectious factors in the development of proliferative syndrome in the children presenting with endogenous uveitis. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftal'mologiya = Russian Pediatric Ophthalmology*, 2012, no. 2, pp. 28–31. (In Russ.)]
 5. Хорошилова-Маслова И.П., Лепарская Н.Л. Роль тромбоцитарного фактора роста в патобиологии эпиретинальных мембран при пролиферативной витреоретинопатии (экспериментально-морфологическое исследование) // Российский офтальмологический журнал. 2016. Т. 9, № 4. С. 59–63. [Khoroshilova-Maslova I.P., Leparskaya N.L. The role of platelet-derived growth factor in pathobiology of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy (an experimental morphological study). *Rossiyskaya pediatricheskaya oftal'mologiya = Russian Ophthalmological Journal*, 2016, vol. 9, no. 4, pp. 59–63. doi: 10.21516/2072-0076-2016-9-4-59-63 (In Russ.)]
 6. Canataroglu H., Varinli I., Ozcan A.A., Canataroglu A., Doran F., Varinli F. Interleukin (IL)-6, interleukin (IL)-8 levels and cellular composition of the vitreous humor in proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy, and traumatic proliferative vitreoretinopathy. *Ocul. Immuno Inflamm.*, 2005, vol. 13, no. 5, pp. 375–381. doi: 10.1080/09273940490518900
 7. Jin Y., Chen H., Xu X., Hu Y., Wang C., Ma Z. Traumatic proliferative vitreoretinopathy: clinical and histopathological observations. *Retina*, 2017, vol. 37, no. 7, pp. 1236–1245. doi: 10.1097/IAE.0000000000001350
 8. Nicholas J. Human Gammaherpesvirus cytokines and chemokine receptors. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2005, vol. 25, no. 7, pp. 373–383. doi: 10.1089/jir.2005.25.373

Авторы:

Петровская М.С., младший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ, Москва, Россия;

Кричевская Г.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ, Москва, Россия;

Денисова Е.В. к.м.н., старший научный сотрудник отдела патологии глаз у детей ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ, Москва, Россия;

Катаргина Л.А., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ, Москва, Россия;

Куликова И.Г. старший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Petrovskaya M.S., Junior Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Krichevskaya G.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Denisova E.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Eye Pathology in Children, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Katargina L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Science, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Kulikova I.G., Senior Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.07.2018
Отправлена на доработку 14.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 16.07.2018
Revision received 14.03.2019
Accepted 22.03.2019

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СЕЛАНКА

А.Ю. Мухина¹, О.А. Медведева¹, М.В. Свищева¹, А.В. Шевченко¹, Н.Н. Ефремова¹, И.И. Бобынцев¹, П.В. Калущий¹, Л.А. Андреева², Н.Ф. Мясоедов²

¹ ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Курск, Россия

² Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Резюме. Согласно современным представлениям, стресс оказывает существенное влияние на состав микробиоценоза за счет изменения проницаемости кишечного барьера и провоспалительного действия. Данное обстоятельство, в свою очередь, изменяет поведенческие реакции, тревожность и стресс-реакцию. В связи с этим представляется перспективным использование нейротропных препаратов на основе регуляторных пептидов, к числу которых относится селанк, для коррекции стресс-индуцированного дисбиоза. Целью работы явилась оценка состояния микробиоценоза толстой кишки крыс при применении селанка и в условиях экспериментально моделированного хронического иммобилизационного стресса. Исследование выполнено на 65 крысах-самцах Вистар, которые были разделены на пять групп по 13 особей в каждой: первая группа представлена крысами, которым вводили физиологический раствор; во вторую группу вошли животные, которым вводили физиологический раствор и моделировали хронический иммобилизационный стресс; животным третьей, четвертой и пятой групп вводили селанк в дозах 80, 250 и 750 мкг/кг массы тела соответственно и моделировали хронический иммобилизационный стресс. Количественное и качественное исследование пристеночной микробиоты толстой кишки экспериментальных животных проводили по методике Л.И. Кафарской и В.М. Коршунова. Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью масс-спектрометра «Maldi Biotyper Microflex» (Bruker, США). Удельное содержание микроорганизмов выражали в Ig КОЕ/г массы исследуемого материала. Для каждого идентифицированного рода микроорганизмов вычисляли относительное среднее и частоту встречаемости. Статистическую значимость различий средних величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Хронический иммобилизационный стресс в эксперименте не привел к смене доминантных представителей микробиоты толстой кишки крыс и не снизил частоту их встречаемости, однако существенно повлиял на значения определяемых показателей в отношении факультативных микроорганизмов, изменив структуру исследуемых популяций за счет увеличения доли условно-патогенных бактерий. Применение селанка привело к нивелированию сдвигов в составе толстокишечного микробиоценоза, вызванных стрессом. Причем значения определяемых показателей в результате применения селанка в дозе 750 мкг/кг достигали таковых в группе не стрессированных животных. Установленные эффекты селанка, предположительно, могут реализовываться за счет как центрального, так и периферического действия препарата, в том числе иммуномодулирующего и противовоспалительного. Таким образом, применение селанка способствовало восстановлению состава микробиоценоза толстой кишки при стрессе.

Ключевые слова: селанк, микробиоценоз, иммобилизационный стресс, микробиота, дисбиоз.

Адрес для переписки:

Мухина Александра Юрьевна
305041, Россия, г. Курск, ул. К. Маркса, 3,
Курский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (4712) 58-81-43 (служебн.); 8 919 135-29-08 (моб.).
E-mail: 111ms@mail.ru

Contacts:

Aleksandra Yu. Mukhina
305041, Russian Federation, Kursk, K. Marksa str., 3,
Kursk State Medical University.
Phone: +7 (4712) 58-81-43 (office); +7 919 135-29-08 (mobile).
E-mail: 111ms@mail.ru

Библиографическое описание:

Мухина А.Ю., Медведева О.А., Свищева М.В., Шевченко А.В., Ефремова Н.Н., Бобынцев И.И., Калущий П.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении селанка // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 805–810. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-805-810

Citation:

Mukhina A.Yu., Medvedeva O.A., Svishcheva M.V., Shevchenko A.V., Efremova N.N., Bobyntsev I.I., Kalutsky P.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. State of rat colon microbiocenosis in chronic restraint stress treated with Selank // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 805–810. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-805-810

STATE OF RAT COLON MICROBIOCENOSIS IN CHRONIC RESTRAINT STRESS TREATED WITH SELANK**Mukhina A.Yu.^a, Medvedeva O.A.^a, Svishcheva M.V.^a, Shevchenko A.V.^a, Efremova N.N.^a, Bobyntsev I.I.^a, Kalutsky P.V.^a, Andreeva L.A.^b, Myasoedov N.F.^b**^a *Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation*^b *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Abstract. It is currently accepted that stress significantly affects composition of microbiocenosis due to changes in permeability of intestinal barrier and pro-inflammatory effects. This, in turn, changes behavioral reactions, anxiety and stress response. In this regard, it seems promising to use regulatory peptide-based neurotropic drugs including Selank to correct stress-induced dysbiosis. Our study was aimed at assessing state of rat colon microbiocenosis in modelled chronic restraint stress and treated with Selank by using 65 Wistar male rats divided into five groups (per 13 rats in each): group 1 — rats injected with saline; group 2 — injected with saline and induced chronic restraint stress; group 3–5 — administered with Selank at dose of 80 µg/kg, 250 µg/kg and 750 µg/kg body weight, respectively, and induced chronic restraint stress. Quantitative and qualitative study of animal colon microbiota was carried out according to the method by L.I. Kafarskaja and V.M. Korshunov. Identification of microorganisms was carried out by using a Maldi Biotyper Microflex mass spectrometer (Bruker, United States). Microbial species-specific composition was presented as lg CFU/g mass of examined sample. For each identified microbial genus, the relative mean and frequency of occurrence were calculated. Statistical significance of differences in mean values was determined by using Student's t-test. Chronic restraint stress in the experiment did not result in affecting dominant microbiota species in rat colon nor reduce their frequency, however, it significantly influenced examined parameters for commensal microbiota disturbing pattern of pathogenic bacterial strains. Use of Selank led to the reversing changes in composition of colonic microbiocenosis caused by stress model. Moreover, magnitude of parameters examined in experiment after applying Selank at dose of 750 µg/kg reached those in non-stressed animals. Thus, effects related to Selank administration may presumably be mediated due to both central and peripheral effects including immunotropic and anti-inflammatory activities which contributed to restoring colon microbiocenosis composition in stress model.

Key words: *Selank, microbiocenosis, restraint stress, microbiota, dysbiosis.*

Введение

В общебиологическом плане стресс является неспецифической психофизиологической реакцией организма на воздействие любых экстремальных факторов физической, биологической и психогенной природы [9]. Современные условия жизнедеятельности приводят к тому, что различные по продолжительности и природе стрессорные факторы воздействуют на человека на протяжении всей жизни. Хронический иммобилизационный стресс, являясь важным аспектом современной медицины, обусловлен такими физиологическими и социальными причинами, как снижение нагрузки на опорно-двигательный аппарат, пребывание в помещениях малого объема, информационные перегрузки, малоподвижный образ жизни.

Известно, что стрессорное воздействие способно модулировать профиль микробиоты [7, 12]. Причем даже кратковременный стресс на ранних этапах развития способен влиять на состояние микробиоценоза толстой кишки в течение всей жизни [8, 11]. Данные аберрации качественного и количественного состава микробиоты, в свою очередь, влияют на поведенческие реакции, когнитивные способности, тревожность и стресс-реакцию [7]. В связи с этим представляется перспективным и патогенетически обоснованным исследование возможности применения нейротропных препаратов на основе регуляторных пептидов для коррекции стресс-индуцированных сдвигов в составе толстокишечного микробиоценоза. Препараты данной группы, к числу которых относится гептапептид селанк, выгодно отлича-

ются от других анксиолитиков и антидепрессантов высокой биологической активностью, полифункциональностью и отсутствием при этом нежелательных эффектов [3]. Установлено, что селанк наряду с нейротропным действием обладает иммуномодулирующей активностью, антикоагулянтными свойствами, снижает ulcerогенные эффекты стресса, что и послужило основанием для выбора селанка с целью коррекции стресс-индуцированного дисбиоза [1, 4, 6].

В связи с вышеизложенным, целью работы явилась оценка состояния микробиоценоза толстой кишки крыс при применении селанка и в условиях экспериментально моделированного хронического иммобилизационного стресса.

Материалы и методы

Исследование проведено на 65 крысах-самцах Вистар весом 250–280 г, которые были получены из Питомника лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Пущино) и содержались в стандартных условиях со свободным доступом к воде и гранулированному корму, при световом режиме 12 ч — свет, 12 ч — темнота и температуре воздуха 22–24°C. Эксперимент выполнен в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным, директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей, и в соответствии с решением регионального этического комитета при

Курском государственном медицинском университете. Исследуемые животные были разделены на пять групп по 13 особей в каждой. Первая группа представлена крысами, которым вводили физиологический раствор; во вторую группу вошли животные, которым вводили физиологический раствор и моделировали хронический иммобилизационный стресс (ХИС); животным третьей, четвертой и пятой групп вводили селанк в дозах 80, 250 и 750 мкг/кг массы тела соответственно и моделировали ХИС.

Применяемый в работе гептапептид Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк), синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН, растворяли в физиологическом растворе и вводили экспериментальным животным парентерально (внутрибрюшинно) в соответствующих дозах за 15 минут до начала стрессорного воздействия в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора.

Хронический иммобилизационный стресс моделировали помещением крыс в индивидуальные тесные пластиковые боксы с отверстиями для вентиляции ежедневно на 2 часа в течение 14 дней [10]. По истечении указанного срока животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом обескровливанием путем забора крови из правого желудочка сердца и выделяли биоптаты толстой кишки.

Количественное и качественное исследование пристеночной микробиоты толстой кишки экспериментальных животных проводили по методике Л.И. Кафарской и В.М. Коршунова [2]. Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью масс-спектрометра «Maldi Biotyper Microflex» (Bruker, США). Удельное содержание микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г массы исследуемого материала.

Для оценки состояния микробиоценоза толстой кишки крыс рассчитывали частоту встречаемости рода. Данный показатель отражает долю животных, у которых обнаружен соответствующий род микроорганизмов. Кроме того, для каждого идентифицированного рода микроорганизмов вычисляли относительное среднее, то есть долю в исследуемой популяции [5].

Статистическую значимость различий средних величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых показателей в исследуемых группах. Обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

Результаты

При исследовании частоты встречаемости идентифицированных микроорганизмов было установлено, что формирование ХИС не привело к изменению значений данного показателя для таких облигатных представителей микро-

биоценоза, как лактобациллы, бифидобактерии и кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью, однако кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью встречалась на 46,5% чаще, чем у животных, не подвергшихся стрессу (табл.).

Вместе с тем отмечалось достоверное увеличение частоты встречаемости ряда факультативных микроорганизмов, относящихся к родам *Klebsiella* (на 61% по сравнению с нестрессированным контролем), *Morganella* (на 38%), *Staphylococcus* (коагулазоотрицательные) (на 62%), *Candida* (на 38%). Отдельные условно-патогенные представители микробиоты, в том числе энтеробактерии, цитробактерии, протеи, ацинетобактерии и золотистый стафилококк, были зарегистрированы только у животных, подвергшихся ХИС.

Статистически значимые различия между значениями определяемого показателя при применении селанка в дозе 80 мкг/кг в условиях ХИС были установлены только для ацинетобактеров, которые не идентифицировались в данной группе животных, и золотистого стафилококка, частота встречаемости которого сократилась на 53,5% по сравнению со стрессированным контролем.

Введение селанка в дозе 250 мкг/кг крысам, подвергшимся ХИС, привело к достоверному снижению частоты встречаемости энтеробактеров на 46,5%, протеев — на 23%, клебсиелл — на 77%, морганелл — на 38,5%, коагулазоотрицательных стафилококков — на 46%, грибов рода *Candida* — на 38% по сравнению со стрессированным контролем. При этом в исследуемой группе не были идентифицированы *Citrobacter* spp., *Acinetobacter* spp. и *Staphylococcus aureus*, которые регистрировались у стрессированных животных в $46 \pm 13,82$, $38 \pm 13,46$ и $61,5 \pm 13,5\%$ случаев соответственно.

В результате применения селанка в дозе 750 мкг/кг сократилась частота встречаемости факультативных бактерий, представленных энтеробактерами (на 46,5%), протеями (на 54%), клебсиеллами (на 69%), морганеллами (на 38,5%) и коагулазоотрицательными стафилококками (на 62%) по сравнению со стрессированным контролем. Кроме того, идентифицированные в условиях ХИС цитробактерии, ацинетобактерии и золотистый стафилококк не определялись в исследуемой группе.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что во всех исследуемых группах ведущую долю популяции составили лактобациллы и бифидобактерии (рис.). Однако в условиях ХИС их относительное среднее значительно сократилось, как и количество *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, при этом доля *E. coli* со сниженной ферментативной активностью возросла на 3,88%.

Снижение под влиянием ХИС числа облигатных представителей толстокишечного микро-

Таблица. Частота встречаемости представителей мукозной микробиоты толстой кишки крыс при применении селанка и в условиях ХИС (% , P±mp)

Table. The occurrence frequency of rats' colon mucous microbiota representatives under restraint stress and Selank administration (% , P±mp)

Выделенные микроорганизмы Isolated microorganisms	Контроль без стресса (введение физ. р-ра) Stress-free control (injection of saline)	Контроль (физ. р-р + ХИС) Control (injection of saline + restraint stress)	Введение селанка в дозе 80 мкг/кг + ХИС Injection of Selank in dose 80 mkg/kg + restraint stress	Введение селанка в дозе 250 мкг/кг + ХИС Injection of Selank in dose 250 mkg/kg + restraint stress	Введение селанка в дозе 750 мкг/кг + ХИС Injection of Selank in dose 750 mkg/kg + restraint stress
<i>Lactobacillus</i> spp.	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
<i>Bifidobacterium</i> spp.	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью <i>E. coli</i> with normal enzymatic activity	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
<i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью <i>E. coli</i> with low enzymatic activity	15±9,9	61,5±13,5*	61,5±13,5	46±13,82	23±11,67
<i>Enterobacter</i> spp.	0	61,5±13,5**	46±13,82	15±9,9*	15±9,9*
<i>Citrobacter</i> spp.	0	46±13,82**	31±12,83	0**	0**
<i>Proteus</i> spp.	0	69±12,83**	38±13,46	23±11,67**	15±9,9**
<i>Klebsiella</i> spp.	31±12,83	92±7,52**	38±13,46	15±9,9**	23±11,67**
<i>Morganella</i> spp.	23±11,67	61,5±13,5*	46±13,82	23±11,67*	23±11,67*
<i>Acinetobacter</i> spp.	0	38±13,46*	0**	0**	0**
<i>Enterococcus</i> spp.	23±11,67	23±11,67	46±13,82	15±9,9	23±11,67
<i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные) <i>Staphylococcus</i> (coagulase-negative)	38±13,46	100±0**	69±12,83	54±13,82**	38±13,46**
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	61,5±13,5**	8±7,52**	0**	0**
<i>Candida</i> spp.	31±12,83	69±12,83*	61,5±13,5	31±12,83*	38±13,46

Примечание. *p ≤ 0,05 по сравнению с группой «введение физиологического раствора», **p ≤ 0,01 по сравнению с группой «введение физиологического раствора», *p ≤ 0,05 по сравнению с группой «физиологический раствор + ХИС», **p ≤ 0,01 по сравнению с группой «физиологический раствор + ХИС».

Note. *p ≤ 0,05 comparing to the group «stress-free control», **p ≤ 0,01 comparing to the group «stress-free control», *p ≤ 0,05 comparing to the group «saline solution + restraint stress», **p ≤ 0,01 comparing to the group «saline solution + restraint stress».

биоценоза привело к увеличению относительного среднего отдельных условно-патогенных родов микроорганизмов, идентифицированных как *Klebsiella* spp., *Morganella* spp., *Staphylococcus* (коагулазоотрицательные), *Candida* spp., а также появлению отсутствовавших у нестрессированных животных бактерий, относящихся к родам *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и виду *Staphylococcus aureus*.

Применение селанка в дозе 80 мкг/кг существенно не изменило структуру микробиоценоза по сравнению со стрессированным контролем.

В результате введения селанка в дозе 250 мкг/кг доля факультативных представителей микробиоты сократилась за счет увеличения количества облигатных микроорганизмов, однако относительное среднее не достигло значений, соответствующих животным, не подвергшимся ХИС.

Наиболее близкие к нестрессированному контролю значения определяемого показателя были зарегистрированы при применении селанка в дозе 750 мкг/кг.

Обсуждение

Согласно современным данным, стресс оказывает провоспалительное действие на кишечник. Это связано с тем, что хронический стресс ингибирует противовоспалительные эффекты вагуса [13]. С другой стороны, гормоны стресса разрушают плотные межклеточные контакты, увеличивают проницаемость стенки кишки, способствуя миграции микроорганизмов и активации местного иммунитета [8, 9, 11, 13].

По нашему мнению, именно эти механизмы лежат в основе того, что ХИС в эксперименте не привел к смене доминантных представителей микробиоты толстой кишки крыс и не снизил частоту их встречаемости, однако существенно повлиял на значения определяемых показателей в отношении факультативных микроорганизмов, изменив структуру исследуемых популяций за счет увеличения доли условно-патогенных бактерий.

Применение селанка привело к нивелированию сдвигов в составе толстокишечного микро-

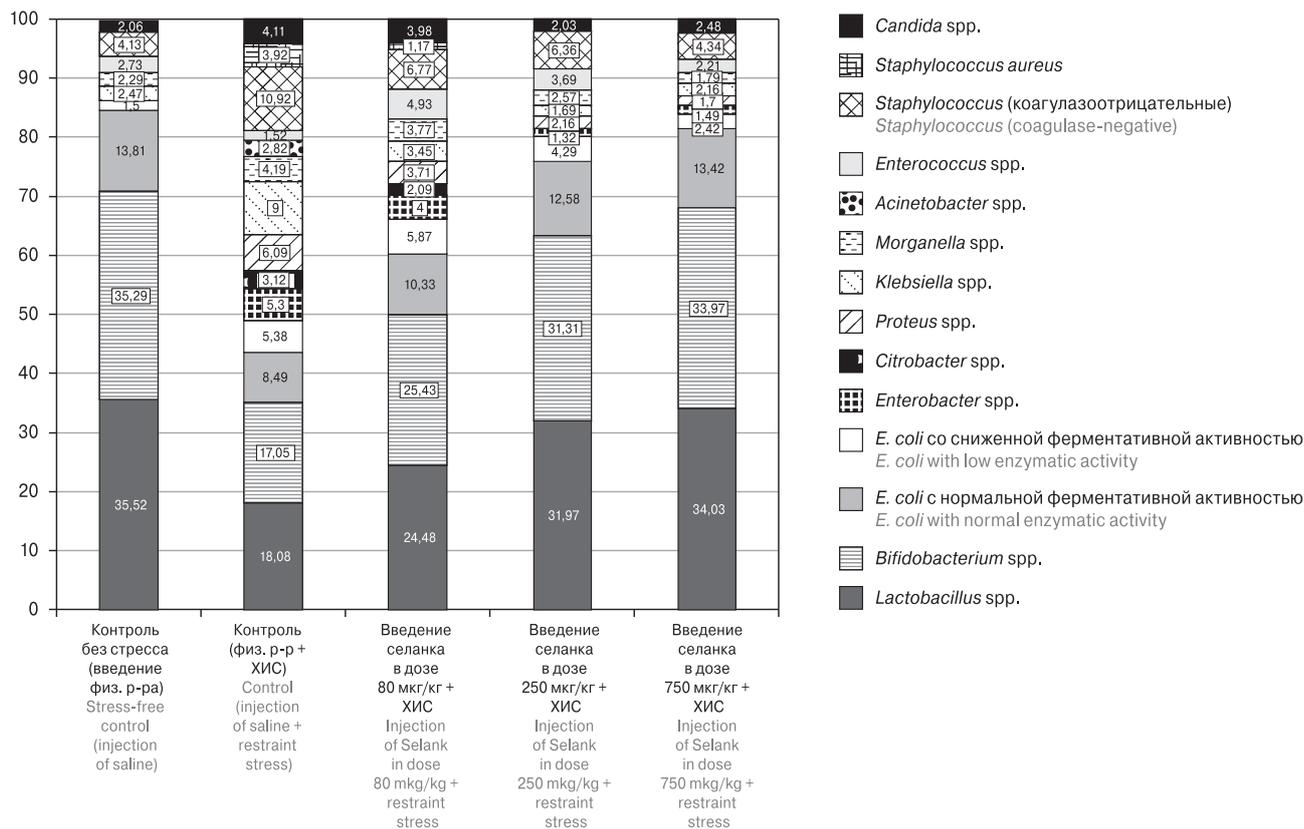


Рисунок. Относительное среднее (доля) представителей мукозной микробиоты в группах сравнения
 Figure. The relative average (share) of mucosal microbiota representatives in the comparison groups

биоценоза, вызванных стрессом. Причем значения определяемых показателей в результате применения селанка в дозе 750 мкг/кг достигали таковых в группе нестрессированных животных.

Установленные эффекты селанка могут реализовываться за счет как центрального, так и периферического действия препарата, так как в настоящее время, наряду с доказанными нейротропными эффектами селанка, рассматриваются и местные механизмы действия нейропептида [1, 3]. Так, системное введение селанка подавляло экспрессию гена IL-6 лейкоцитами периферической крови, а также ингибировало экспрессию генов хемокинов и Мар2k1-киназы, что, предполо-

жительно, играет роль в комплексной регуляции ответа на воспаление [4, 6]. По данным Григорьева и коллег, использование селанка увеличивало фагоцитарный индекс и метаболическую активность лейкоцитов крови *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, установлено иммуномодулирующее действие селанка, выражающееся в регуляции цитокинового баланса Th1/Th2 лимфоцитов [1].

Выявленные механизмы могут существенно влиять на состояние нормобиоценоза, способствуя восстановлению динамического равновесия между состоянием слизистой толстой кишки и микробиотой благодаря нейротропным и иммулотропным эффектам селанка.

Список литературы/References

1. Андреева Л.А., Мезенцева М.В., Наровлянский А.Н., Нагаев И.Ю., Шаповал И.М., Щербенко В.Э., Руссу Л.И., Мясоедов Н.Ф. Перспективы создания новых пептидных лекарственных препаратов, обладающих противомикробной и иммуномодулирующей активностью // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 2. С. 171–176. [Andreeva L.A., Mezenцева M.V., Narovlyanskiy A.N., Nagaev I.J., Shapoval I.M., Scherbenko V.E., Russu L.I., Miasoedov N.F. The perspectives of development of new peptide preparations for clinical use which have anti-infection and immune-modulating activity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no 2, pp. 171–176. doi: 10.15789/2220-7619-2011-2-171-176 (In Russ.)]
2. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В., Воробьев А.А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов // Вестник РАМН. 2006. № 2. С. 6–10. [Bogdanova Ye.A., Nesvizhsky Yu.V., Vorobyov A.A., Afanasyev S.S., Korneyev M.L. A study of parietal gastrointestinal microflora of rats after oral administration of probiotics. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2006, no. 2, pp. 6–10. (In Russ.)]
3. Козловский И.И., Андреева Л.А., Козловская М.М., Надорова А.В., Колик Л.Г. О роли опиоидной системы в формировании особенностей анксиолитического действия пептидного препарата селанка // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т. 75, № 2. С. 10–13. [Kozlovskii I.I., Andreeva L.A., Kozlovskaya M.M., Nadorova A.V.,

- Kolik L.G. The Role of Opioid System in Peculiarities of Anti-Anxiety Effect of Peptide Anxiolytic Selank. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2012, vol. 75, no 2, pp. 10–13. doi: 10.30906/0869-2092-2012-75-2-10-13 (In Russ.)
4. Коломин Т.А., Агапова Т.Ю., Агниулли Я.В., Шрам С.И., Шадрин М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Изменение транскрипционного профиля гиппокампа в ответ на введение аналога тафтцина селанка // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2013. Т. 63, № 3. С. 365–373. [Kolomin T.A., Agarova T.Iu., Agniullin Ia.V., Shram S.I., Shadrina M.I., Slominskiy P.A., Limborskaia S.A., Miasoedov I.F. Transcriptome alteration in hippocampus under the treatment of tuftsina analog Selank. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, 2013, vol. 63, no. 3, pp. 365–374. doi: 10.7868/S0044467713030052 (In Russ.)]
 5. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с. [Magurran E. Ecological diversity and its measurement. *Moscow: Mir*, 1992. 184 p. (In Russ.)]
 6. Учакина О.Н., Учакин П.Н., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Щербенко В.Э., Мезенцева М.В., Габаева М.В., Соколов О.Ю., Зозуля А.А., Ершов Ф.И. Иммуномодулирующее действие селанка у больных с тревожно-астеническими расстройствами // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. Т. 108, № 5. С. 71–75. [Uchakina O.N., Uchakin P.N., Miasoedov N.F., Andreeva L.A., Scherbenko V.E., Mezentseva M.V., Gabaeva M.V., Sokolov O. Yu., Zozulia A.A., Ershov F.I. Immunomodulatory effects of selank in patients with anxiety-asthenic disorders. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova = Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2008, vol. 108, no 5, pp. 71–75. (In Russ.)]
 7. Crumeyrolle-Arias M., Jaglin M., Bruneau A., Vancassel S., Cardona A., Dauge V., Naudon L., Rabot S. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, no. 42, pp. 207–217. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.01.014
 8. De Palma G., Blennerhassett P., Lu J., Deng Y., Park A.J., Green W., Denou E., Silva M.A., Santacruz A., Sanz Y., Surette M.G., Verdu E.F., Collins S.M., Bercik P. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nat. Commun.* 2015, no. 6: 7735. doi: 10.1038/ncomms8735
 9. Galley J.D., Nelson M.C., Yu Z., Dowd S.E., Walter J., Kumar P.S., Lyte M., Bailey M.T. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC Microbiol.*, 2014, no. 14, p. 189. doi: 10.1186/1471-2180-14-189
 10. Kim M.H., Leem Y.H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. *J. Exerc. Nutrition Biochem.*, 2014, vol. 18, no 1, pp. 97–104. doi: 10.5717/jenb.2014.18.1.97
 11. Moussaoui N., Jacobs J.P., Larauche M., Biraud M., Million M., Mayer E. Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning: influence of sex. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 2017, vol. 23, pp. 135–143. doi: 10.5056/jnm16105
 12. Sudo N. Effects of gut microbiota on stress response and behavioral phenotype of the host. *Brain Nerve*, 2016, vol. 68, no. 6, pp. 595–605. doi: 10.11477/mf.1416200447
 13. Taché Y., Larauche M., Yuan P.Q., Million M. Brain and gut CRF signaling: biological actions and role in the gastrointestinal tract. *Curr. Mol. Pharmacol.*, 2018, vol. 11, pp. 51–71. doi: 10.2174/1874467210666170224095741

Авторы:

Мухина А.Ю., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Медведева О.А., д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Свищева М.В., очный аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Шевченко А.В., к.м.н., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Ефремова Н.Н., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Бобынцев И.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Калуцкий П.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск, Россия;
Андреева Л.А., к.х.н., руководитель сектора регуляторных пептидов отдела химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН, Москва, Россия;
Мясоедов Н.Ф., академик РАН, д.х.н., зав. отделом химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН, Москва, Россия.

Authors:

Mukhina A.Yu., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Medvedeva O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Svishcheva M.V., PhD Student, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Shevchenko A.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Efremova N.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Bobyntsev I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Pathophysiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Kalutsky P.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation;
Andreeva L.A., PhD (Chemistry), Head of the Regulatory Peptide Sector, Department of Physiologically Active Substances Chemistry, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;
Miasoedov N.F., RAS Full Member, PhD, MD (Chemistry), Head of the Department of Physiologically Active Substances Chemistry, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation.

ABUNDANCE OF *IXODES PERSULCATUS* TICKS IN KOMI REPUBLIC AS A FUNCTION OF AN AIR TEMPERATURE

A.A. Tronin^a, N.K. Tokarevich^b, B.R. Gnativ^c

^a Scientific Research Center for Ecological Safety, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c Center for Hygiene and Epidemiology of Komi Republic, Syktyvkar, Russian Federation

Abstract. The sharp rising incidence of tick-borne encephalitis (TBE) in Komi Republic at the North-east of European Russia was recorded last decades. Tick-bite incidence also was grown. Rapid rise of TBE incidence growth and Ixodidae ticks depends on a number of factors, and the impact of climate change being one of them. *Ixodes persulcatus* ticks is considered as a main vector of TBE in Komi. Our objective is to estimate the influence of air temperature change on the tick-bite incidence and *Ixodes persulcatus* population in Komi. Komi Republic is located near the Polar circle where the northern frontier of *Ixodes persulcatus* ticks situated and we expected the growth of tick's population. The number of Komi inhabitants seeking medical care after tick bites in 1992–2014 was considered. Gridded monthly air temperature data with grid size 0.5 degree were recalculated to temperature referred to Komi administrative units. The time series of annual number of tick victims from 1992 till 2014 and model air temperature from 1948 till 2016 for all Komi administrative units were compiled. We analyzed the data on tick-bite incidence in Komi administrative units in relation to changes in local annual average air temperature within the study area. The linear dependence of the tick-bite incidence on air temperature was established when of the tick-bite incidence is represented in logarithm form. The tick population depends not only on temperature but humidity, landcover and hosts. Described areas of Komi belong to humid climate, where precipitations exceed evaporation. Most of the Komi territory is covered by taiga with underwood, grass and bush. Hosts of the first and the major levels are represented by birds and rodents. The dependence of tick-bite incidence and temperature looks like “Malthus's law”, but the development of population depends on temperature not on time. The exponential growth in the nearest future will ceased and the population will proceed to stable phase. Ticks population in Komi Republic is moving to the North and the air temperature determines the dynamics of population.

Key words: tick-borne encephalitis, tick-bite incidence, *Ixodes persulcatus*, population, climate change, air temperature, Komi Republic.

ЧИСЛЕННОСТЬ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ КАК ФУНКЦИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОЗДУХА

Тронин А.А.¹, Токаревич Н.К.², Гнатив Б.Р.³

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия

Резюме. Резкий рост заболеваемостью клещевым энцефалитом зафиксирован в Республике Коми на Северо-Востоке Европейской части России в последние десятилетия. Также выросло число нападений клещей.

Адрес для переписки:

Тронин Андрей Аркадьевич
197110, Санкт-Петербург, ул. Корпусная, 18,
Санкт-Петербургский НИЦ экологической безопасности РАН.
Тел.: 8 (812) 499-64-54 (служебн.).
E-mail: a.a.tronin@ecosafety-spb.ru

Contacts:

Andrei A. Tronin
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Korpusnaya str., 18,
Scientific Research Center for Ecological Safety.
Phone: +7 (812) 499-64-54 (office).
E-mail: a.a.tronin@ecosafety-spb.ru

Библиографическое описание:

Тронин А.А., Токаревич Н.К., Гнатив Б.Р. Численность клещей *Ixodes persulcatus* в Республике Коми как функция температуры воздуха // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 811–816. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-811-816

Citation:

Tronin A.A., Tokarevich N.K., Gnativ B.R. Abundance of *Ixodes persulcatus* ticks in Komi Republic as a function of an air temperature // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 811–816. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-811-816

Основным носителем вируса клещевого энцефалита является клещ *Ixodes persulcatus*. Целью работы является определение влияния изменений температуры воздуха на число нападений клещей на человека и численность популяции *Ixodes persulcatus* в Коми. Республика Коми находится у Полярного круга, на северной границе ареала *Ixodes persulcatus*, который, по-видимому, будет расширяться и будет расти численность популяции клещей. В работе рассматривается число обратившихся за медицинской помощью жителей Коми, подвергшихся нападению клещей в 1992–2014 гг. Было проанализировано изменение среднегодовой температуры воздуха и числа пострадавших от нападения клещей. В результате исследований был сделан вывод о расширении ареала клещей на север и определяющей роли температуры воздуха в этом процессе. Зависимость числа пострадавших от температуры похожа на «закон Мальтуса», при этом развитие популяции зависит не от времени, а от температуры воздуха.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, нападение клещей, *Ixodes persulcatus*, популяция, изменение климата, температура воздуха, Республика Коми.

Introduction

Tick-borne infections are an increasing threat on healthcare in many countries. Tick-borne encephalitis (hereinafter — TBE) was included in the list of notifiable diseases in EU in 2012 [3], and since then it is notifiable in the most of European countries [4]. Clear growth of TBE cases observed in some regions of northern Europe [7, 12, 13]. In 2014, 2057 cases of TBE were notified in the EU. There has been a nearly 400% increase of reported cases in European endemic areas over the past 30 years [11].

Rapid rise of TBE incidence growth and Ixodidae ticks (main TBE vector) depends on a number of factors [8, 10], and the impact of climate change being one of them [1, 6, 9].

Ixodes persulcatus is considered as the main vector for TBE and Lyme borreliosis in Komi republic at the North-East of European Russia. *Ixodes persulcatus* is dominating species in Komi Republic [12]. The clear rise of TBE incidence in Komi was recorded last decades, while the annual TBE incidence in Russia has been decreased. We revealed in a strong correlation between the change in the air temperature and TBE incidence and the tick-bite incidence (fig. 1) in neighbor Komi and Arkhangelsk Oblast of Russia [14, 15].

Earlier we also have shown that the increase in average annual air temperature and “effective” temperature (at the period of tick activity) has a significant impact on the northward expansion of ixodid ticks and the rise in TBE incidence in Komi and Arkhangelsk Oblast of Russia [14].

Most of the Komi territory is covered by taiga (about 89%), far North-East occupied by tundra (2%). Other vegetation is represented by intermediate forms, swamps and meadows. Approximately 32,800 km² of mostly boreal forest (as well as some alpine tundra and meadows) in the Northern Ural Mountains have been recognized in 1995 as a UNESCO World Heritage site, Virgin Komi Forests. It is the first natural UNESCO World Heritage site in Russia and the largest expanse of virgin forests in Europe. Widely spread of Siberian spruce, Scots pine and birch.

Komi climate is cold continental, subarctic. Annual air temperature at the period 1970–2013 was about -1.3°C and tends to growing. Total precipitation are in the range of 600–700 mm per year, evaporation is about 200–300 mm per year, so the climate is humid with the prevalence of precipitations above evaporation. Komi consists of 20 administrative units: 19 rural districts and 1 city district (Syktyvkar — a capital). Total population of Komi is estimated about 850 thousand in 2017, and Syktyvkar city population — 260 thousand.

The main aim of the research was to study the development of *I. persulcatus* as a population in Komi as a function of air temperature.

Materials and methods

Epidemiological data. There are two main possibilities to assess the number of ticks in Komi. First is direct collection of ticks from vegetation, second is analysis the number of local inhabitants seeking medical care after tick bites.

Ticks were gathered from vegetation in dull calm days with flannel flag sized 1.0×0.6 m when the air temperature was $12-18^{\circ}\text{C}$, and humidity 70–90%. Every 5 minutes ticks were removed from the flag using a surgical forceps, placed individually into a glass vial, and delivered to the laboratory during the same day.

The number of Komi inhabitants seeking medical care after tick bites in 1992–2014 was considered. It is very specific parameter recorded by Soviet and Russian medical statistics. Komi population is widely informed about a need to seek medical care in the case of ticks bite. The background information including date and place of the event was provided to Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор) by medical institutions of each Komi district, and the tick-bite incidence rate, i.e. number of tick victims per 100 thousand of population (hereinafter: TBIR) was calculated as follows:

$$TBIR = N_{tv} \times 100\,000/p, \quad (1)$$

here N_{iv} is number of tick victims within the district under study during the year, and p is the number of the district inhabitants. Syktyvkar city inhabitants are “bitten” by ticks in adjacent Syktyvdinsk district mostly, and for the ease of data processing we considered those two units together.

We analyzed the number of tick victims in the research. The number of tick victims depends not only on ticks abundance but on variation in human activities, the level of medical care and public awareness about ticks danger. We have considered all these reasons in previous research [15] and now can approve the number of ticks in nature is equivalent to the number of tick victims. Thus, the annual number of tick victims referred to Komi administrative units from 1992 till 2014 were involved in processing.

Meteorological data. Meteorological data (air temperature from 1948 to 2016) were obtained from National Centers for Environmental Information, USA [5]. Data set “CPC Monthly Global Surface Air Temperature Data Set” is gridded averaged monthly air temperature (at 2 m altitude). Grid size was 0.5 degree for whole globe and time range covers from 1948 to present time. Gridded monthly air temperature data were recalculated using ArcGIS software to temperature referred to Komi administrative units. The average annual air temperature AT_j was calculated from the average monthly values.

$$AT_j = \frac{1}{12} \sum_{i=1}^{12} (T_{ij}), \quad (2)$$

here T_{ij} is monthly average air temperature on unit (district of Komi) j in month i . This way AT_j for all Komi districts were obtained.

The average annual air temperature suffers from strong year-to-year fluctuation. Various methods apply to raw temperature data to select climatic change: averaging, trend compilation. A polynomial function of degree two was calculated for average annual air temperature of Komi administrative units using Microsoft Excel interpolation tools (fig. 2).

When polynomial functions were compiled real air temperature were recalculated to model one to avoid fluctuations. These way model air temperatures (mAT_j) were calculated for all Komi districts. The time series of annual number of tick victims from 1992 till 2014 and model air temperature from 1948 till 2016 for all Komi administrative units were compiled as a result of preliminary data processing.

Results

Komi administrative units modeled annual air temperatures were compared with number of tick victims for the same administrative units. Primary sample with 19 districts \times 23 years = 437 records was compiled. Number of tick victims equal to zero was excluded from the data sample. It’s mean that no sense

to analyze relation between temperature and number of tick victims in area where ticks can’t survive. For example, far north administrative units of Komi such as Vorkurta and Inta had annual air temperature below -6 and -4°C respectively at the begin-

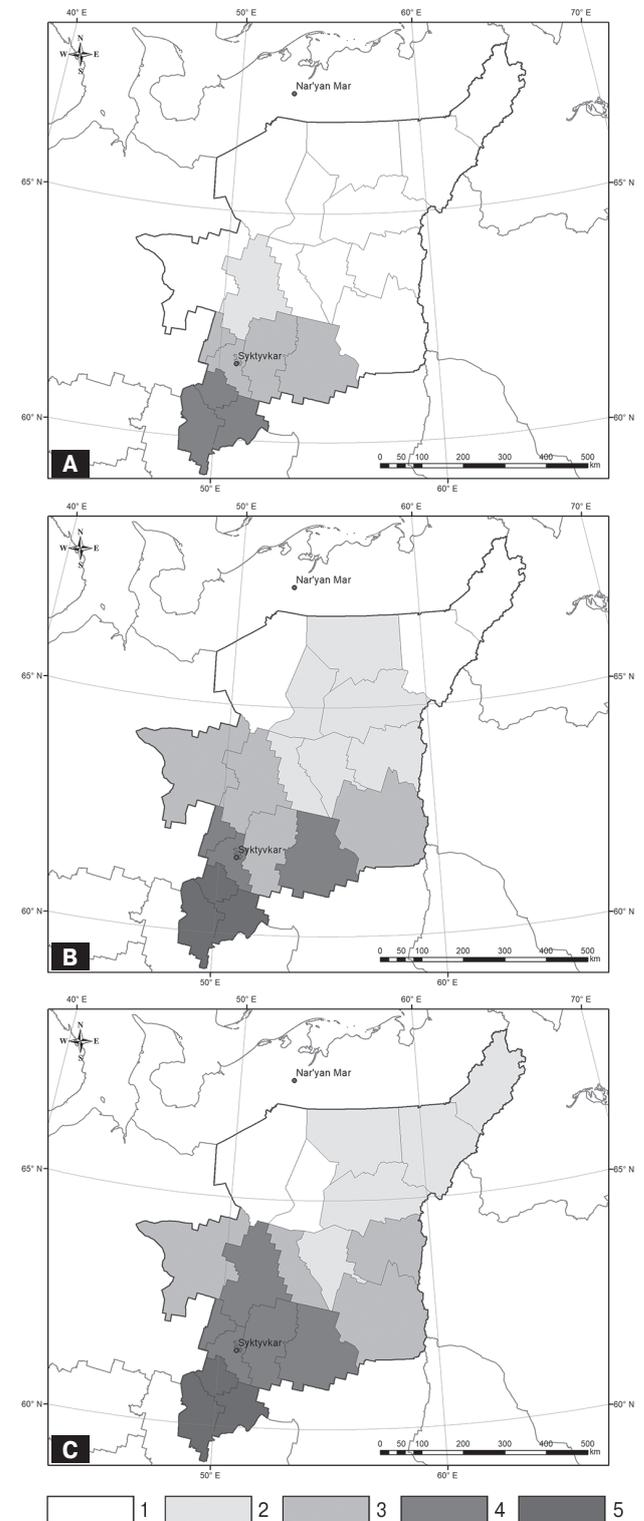


Figure 1. Mean tick-bite incidence rate in Komi districts in 1992–2001 (A), 2002–2011 (B) and 2012–2014 (C)

1 — $< 0,1$; 2 — $0,1-10$; 3 — $10-100$; 4 — $100-1000$; 5 — > 1000 .

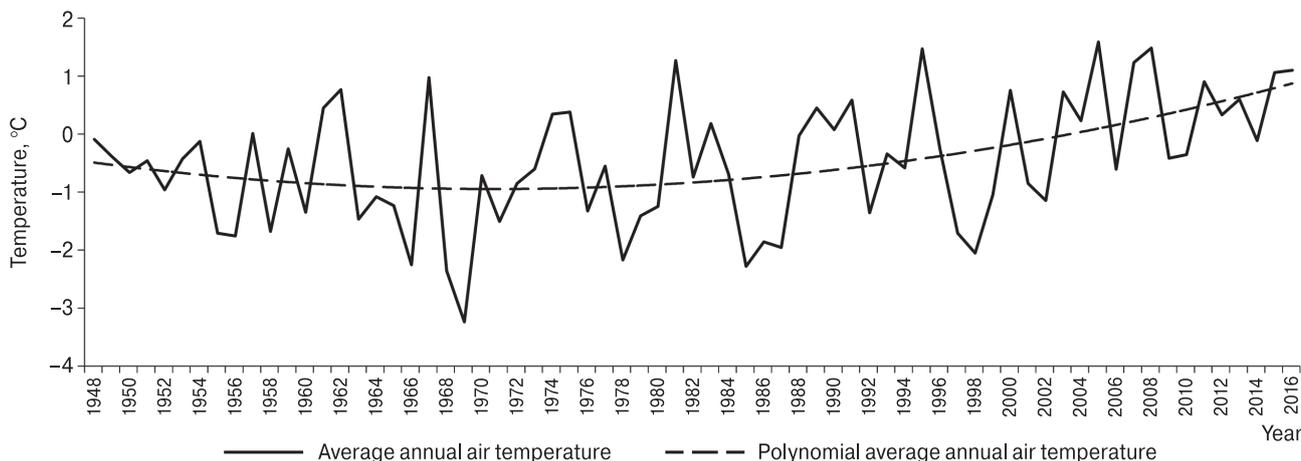


Figure 2. Average annual air temperature and polynomial function of degree two, Uhta administrative units, Komi Republic

ning of 90th. Only sporadic cases of tick victims were recorded in these districts. The data sample with 223 conjugate records (modeled annual air temperatures and number of tick victims) was extracted from primary sample. Results are illustrated on figure 3.

Visual analysis indicates the linear dependence of the tick-bite incidence on air temperature when of the tick-bite incidence is represented in logarithm form. Digital solution shows the equation of the regression:

$$TBIR = 15.3 \times e^{1.3934 \times mATj} \tag{3}$$

The Pearson linear correlation coefficient between modeled annual air temperature and a logarithm of number of tick victims was 0.84 ($p < 0.0001$).

This is very impressive equation (3) that manifests clear dependence of the number of tick victims and

consequently number of ticks on air temperature. And this equation is very similar to so call “Malthus’s law” described the exponential unimpeded growth of population in time:

$$X = X_0 \times e^{(R \times t)} \tag{4}$$

where: X — a number of species in a population, X_0 — initial number of species in a population, R — a coefficient of proportionality (constant in “Malthus’s law”), t — time.

Discussion

Ticks flag collection up to this moment is considered in Russia as a “classical” method to define ticks abundance on local territory. Data were gathered by flag method cannot be extrapolated on vast areas. Unfortunately, ticks abundance monitoring doesn’t executed at the most of Russian regions [2]. The similar situation is observed in Komi Republic, where direct collection of ticks from vegetation was accomplished in separate years and only in south areas of the republic. It is impossible from practical point of view to build complete database about ticks abundance for Komi Republic based on flag collection.

Thus, we have used another approach to get information about ticks population — the number of tick victims registered by official medical statistics of Komi Republic. This method has some limitation (see “Epidemiological data”), but from the position of practical medicine it provides important information not only about tick abundance but the frequency of tick-human contacts. It is hard to explain of the growth of the number of tick victims in Komi by people awareness as is accompanied by the rise of TBE incidence [15]. Long-term monitoring on the number of tick victims and TBE rate allows us to as-

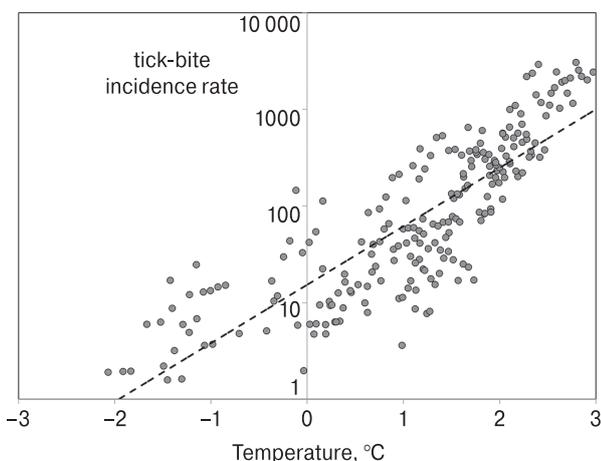


Figure 3. Komi administrative units modeled annual air temperatures and tick-bite incidence rate, 1992–2014. Dashed line shows exponential regression (see equation 3)

sess the real tick population in Komi Republic taking into account high qualification of local medical service.

The weakest thesis in our research is the hypothesis of an adequacy of the number of ticks in nature to the number of tick victims. Obviously not all Komi inhabitants bitten by ticks seek medical care. Various population density and type of inhabitant's activity may impinge relations between ticks and tick victims. High and persistent tick-bite incidence in some Komi districts says in our hypothesis favor. This value exceeds 1000 in one of the south Komi districts from 2006 till 2014. The crucial importance for our results consists in perennial trend of TBIR not only absolute values. It cannot be excluded the rise of inhabitant's awareness about the danger of tick bites.

Our equation (3) describes the population growth as a function of temperature while "Malthus's law" as a function of time. From the one hand the temperature is a function of time in Komi now (see fig. 3) and we can replace a temperature to time. From the other hand there are no sense to wait the incipience of tick population in areas where the annual temperature below -4°C . The tick population depends on temperature, humidity, landcover and hosts. Described areas of Komi belong to humid climate, where precipitations exceed evaporation. Most of the Komi territory is covered by taiga with underwood, grass and

bush as was mentioned above that is essential for tick population. Hosts of the first and the major levels are represented by birds with 239 species and 22 species of rodents. Widely spread such large animals as moose, reindeer, gray wolf and even wild boar. This way only the temperature constrains the extension of tick population in north direction. The coefficient of proportionality in equation (3) close to 1 (in our case about 1.4) indicates that the population resides in good condition.

"Malthus's law" is a first step in a population cycle. More comprehensive model describes the limited growth of population as a logistic function or "Verhulst's law". The initial stage of growth is approximately exponential like in "Malthus's law", then, as saturation begins, the growth slows, and at maturity, growth stops.

Conclusion

Ticks population in Komi Republic spreads to the North and the temperature controls the dynamics of population. The relation of tick victims and temperature looks like "Malthus's law", but the development of population depends on temperature not on time. The exponential growth in the nearest future will ceased and the population will proceed to stable phase. Such stable phase is already observed in south districts of Komi Republic.

References

1. Второй оценочный доклад Росгидромета об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации. Общее резюме. М.: Росгидромет, 2014. 61 с. [Second Roshydromet Assessment Report on Climate Change and Its Consequences in Russian Federation. Moscow: Roshydromet, 2014. 56 p.]
2. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Комментарий, 2013. 463 с. [Korenberg E., Pomelova V., Osin N. Infections with natural focality transmitted by Ixodid ticks. Moscow: Kommentarij, 2013. 463 p.]
3. Amato-Gauci A.J., Zeller H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union. *Eurosurveillance*, 2012, vol. 17, no. 42.
4. Amicizia D., Domnich A., Panatto D., Lai P.L., Cristina M.L., Avio U., Gasparini R. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, vol. 9, no. 5, pp. 1163–1171. doi: 10.4161/hv.23802
5. Fan Y., van den Dool H. A global monthly land surface air temperature analysis for 1948-present. *J. Geophys. Res.*, 2008, vol. 113, pp. 1–18.
6. Hedlund C., Blomstedt Y., Schumann B. Association of climatic factors with infectious diseases in the Arctic and subarctic region — a systematic review. *Glob. Health Action*, 2014, no. 7. doi: 10.3402/gha.v7.24161
7. Jaenson T.G., Hjertqvist M., Bergstrom T., Lundkvist A. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit. Vectors*, 2012, no. 5: 184. doi: 10.1186/1756-3305-5-184
8. Knap N., Avšič-Županc T. Factors affecting the ecology of tick-borne encephalitis in Slovenia. *Epidemiol. Infect.*, 2015, vol. 143, no. 10, pp. 2059–2067. doi: 10.1017/S0950268815000485
9. Kříž B., Kottl. I., Daniel M., Vráblík T., Beneš Č. Impact of climate changes on the incidence of tick-borne encephalitis in the Czech Republic in 1982–2011. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2015, vol. 64, no. 1, pp. 24–32.
10. Ostfeld R.S., Brunner J.L. Climate change and Ixodes tick-borne diseases of humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2015, vol. 370, no. 1665, doi: 10.1098/rstb.2014.0051
11. Semenza J., Suk J. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2018, vol. 365, no. 2. doi: 10.1093/femsle/fnx244
12. Skarpaas T., Golovljova I., Vene S., Ljøstad U., Sjørnsen H., Plyusnin A., Lundkvist Å. Tickborne Encephalitis Virus, Norway and Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, vol. 12, no. 7, pp. 1136–1138. doi: 10.3201/eid1207.051567
13. Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology risk areas and virus strains in Europe and Asia — An overview. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2011, vol. 2, no. 1, pp. 2–15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.007

14. Tokarevich N., Tronin A., Blinova O., Buzinov R., Boltenkov V., Yurasova E., Nurse J. The impact of climate change on the expansion of *Ixodes persulcatus* habitat and the incidence of tick borne encephalitis in the north of European Russia. *Glob. Health Action*, 2011, no. 4: 8448. doi: 10.3402/gha.v4i0.8448
15. Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: the case of the Komi Republic. *Int. J. Circumpolar. Health*, 2017, vol. 76, no. 1: 1298882. doi: 10.1080/22423982.2017.1298882

Авторы:

Тронин А.А., д.г.-м.н., директор Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Токаревич Н.К., д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозов ФБУН НИИ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Гнатив Б.Р., к.м.н., главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия.

Authors:

Tronin A.A., PhD, MD (Geology and Mineralogy), Director, Scientific Research Center for Ecological Safety, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

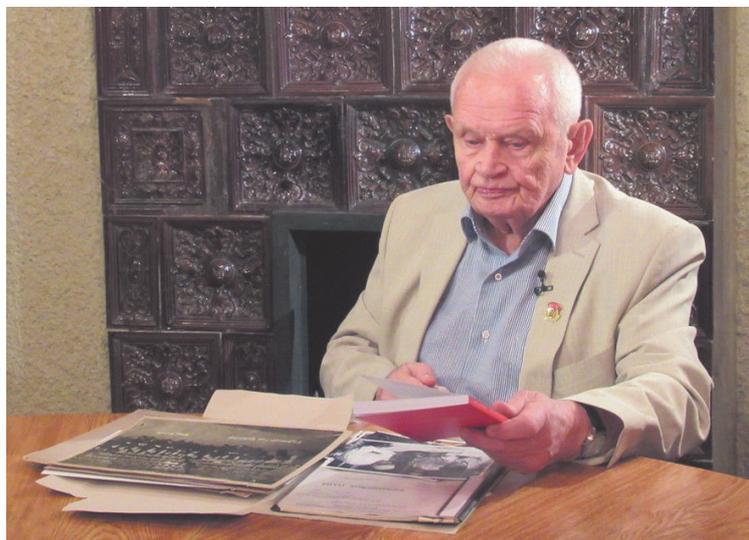
Tokarevich N.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Zoonanthroponoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Gnativ B.R., PhD (Medicine), Medical Director, Center for Hygiene and Epidemiology of Komi Republic, Syktyvkar, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.12.2018
Принята к печати 30.05.2019

Received 24.12.2018
Accepted 30.05.2019

К 90-ЛЕТИЮ АЛЕКСАНДРА АНАТОЛЬЕВИЧА СМОРОДИНЦЕВА



27 декабря 2019 г. исполняется 90 лет видному советскому и российскому ученому, профессору, доктору медицинских наук, действительному члену Петровской Академии наук и искусств Санкт-Петербурга Смородинцеву Александру Анатольевичу.

Александр Анатольевич родился в Ленинграде в семье врачей. Его отец — Анатолий Александрович Смородинцев — выдающийся российский ученый, впоследствии один из основоположников советской вирусологии, профессор, академик АМН СССР, почетный член Нью-Йоркской академии наук и Королевского медицинского общества Великобритании, эксперт Комитета по вирусологии ВОЗ, организатор лаборатории вирусологии в Институте имени Пастера; мать — врач-психиатр. В октябре 1942 г. Ал.А. Смородинцев был эвакуирован из Ленинграда в Москву, где в 1948 г. окончил с серебряной медалью среднюю школу и вернулся с родителями в Ленинград.

В 1948 г. стал студентом лечебного факультета 1-го Ленинградского медицинского института им. И.П. Павлова. В 1954 г. закончил 1-й ЛМИ, получив диплом «Врач-лечебник» по специальностям «Терапия», «Хирургия», «Акушерство» и «Инфекционные болезни». По распределению был направлен в аспирантуру Центрального рентгено-радиологического института Министерства здравоохранения СССР, которую окончил в 1958 г., защитив кандидатскую диссертацию на тему «Развитие экспериментальных вирусных инфекций и иммунитет у животных на фоне лучевой болезни». В этот период своей жизни Ал.А. Смородинцев принимал участие в разработке живой вакцины против полиомиелита на базе отдела вирусологии Института экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР, где выполнял часть своей диссертационной работы.

В 1959 г. был избран по конкурсу на должность старшего научного сотрудника в лабораторию гриппа Ленинградского НИИЭМ им. Пастера. Разработал методику получения новых культур тканей из почек эмбрионов человека для выделения малоизвестных тогда парагриппозных вирусов, установив их высокую значимость среди ОРВИ у детей в Ленинграде. В 1962 г. был избран старшим научным сотрудником в отдел вирусологии Института экспериментальной медицины АМН СССР. Вместе с группой сотрудников произвел выделение и разработал методы культивирования вируса почти неизвестного в то время гепатита В. Тогда же Ал.А. Смородинцев стал первым ученым в СССР, организовавшим цикл работ по исследованию недавно открытого интерферона.

В 1967 г. Ал.А. Смородинцев стал одним из организаторов Всесоюзного НИИ гриппа МЗ СССР, где возглавил лабораторию интерферона. В связи с этими исследованиями в 1967–1968 гг. получил стипендию от Wellcome Research Foundation и был командирован в г. Солсбери (Англия) для работы

в Центре по изучению простудных заболеваний (Common Cold Research Unit). На людях-волонтерах с экспериментальными гриппозными, риновирусными и парагриппозными инфекциями проводил оценку формирования интерферона. Находясь по одному месяцу в лабораториях фирм Imperial Chemical Industries и Glaxo Laboratories, провел количественные биохимические исследования интерферона в образцах, полученных ранее от волонтеров.

В 1970 г. Ал.А. Смородинцев защитил докторскую диссертацию, посвященную индукции интерферона у людей и различным группам индукторов интерферона в ходе эпидемий гриппа в нашей стране. В 1971 г. ему присвоено ученое звание профессора.

В 1976 г. приказом Министра здравоохранения СССР переведен из ВНИИ гриппа в Ленинградский НИИЭМ им. Пастера; назначен руководителем лаборатории детских вирусных инфекций, где возглавил работу по созданию, совершенствованию и внедрению в практику вакцин против кори, паротита и краснухи. Обосновал целесообразность коревой ревакцинации, которая при поддержке ГИСК им. Л.А. Тарасевича была введена с 1986 г. в нашей стране как обязательная для всех детей перед поступлением в школу. Это привело к 10-кратному снижению заболеваемости корью в России. В те же годы были проведены работы по восстановлению иммуногенной активности исходного коревого вакцинного штамма «Л-16».

В 1978 г. Ал.А. Смородинцеву удалось спасти от уничтожения вакцину «Л-3» против эпидемического паротита, а позднее (в 1981 г.) подготовить повторное ее внедрение в практику здравоохранения. Ученый также участвовал в разработке эритроцитарных диагностических препаратов для выявления краснухи, кори и паротита.

В 1994 г. Ал.А. Смородинцев был избран членом-корреспондентом, а в 2002 г. — действительным членом Петровской Академии наук и искусств Санкт-Петербурга.

В конце XX — начале XXI вв. Александр Анатольевич Смородинцев был включен в число 20 000 известных медиков нашей планеты в сборник «Marquis Who'sWho in Medicine and Healthcare» (1999—2000).

В 2001 г. ученый избран адъюнкт-профессором кафедры тропической медицины Университета им. Дж. Вашингтона (США).

Александр Анатольевич Смородинцев награжден знаком «Отличник здравоохранения СССР», медалью «За доблестный труд» и 12 медалями как ветеран Великой Отечественной войны.

Ученым опубликовано более 200 научных статей, он является автором и соавтором пяти монографий, семи научно-популярных книг, 10 изобретений и одного патента РФ; под его руководством защищено 14 кандидатских диссертаций.

В настоящее время Александр Анатольевич, будучи пенсионером, пишет научно-популярные книги о вирусологии, принимает участие в телевизионных проектах, занимается патриотическим воспитанием молодежи. Благодаря инициативе и усилиям Александра Анатольевича в апреле 2018 г. Санкт-Петербургскому НИИ гриппа присвоено имя его отца — Анатолия Александровича Смородинцева.

Редакционная коллегия журнала «Инфекция и иммунитет», коллеги по работе, соратники, ученики, родные, близкие и друзья от души поздравляют Александра Анатольевича Смородинцева с Юбилеем и желают ему здоровья и благополучия.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

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

Размеры иллюстраций:

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

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

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

Плата за публикацию статей

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

Подготовка статей

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

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

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

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

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

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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Азовцева О.В.	787	Кадырова Р.А.	763	Медведева О.А.	805	Тапальский Д.В.	671
Андреева Л.А.	805	Калуцкий П.В.	805	Миндлина А.Я.	779	Топорков А.В.	743
Архипов Г.С.	787	Капустина Т.А.	687	Молчанова Е.В.	743	Тотоян Арег А.	703
Архипова Е.И.	787	Карпов А.В.	787	Мошникова А.Н.	703	Тотоян Н.А.	703
Баркова И.А.	743	Катаргина Л.А.	800	Мухина А.Ю.	805	Тюпкина О.Ф.	680
Баязитова Л.Т.	680	Князев Д.И.	723	Мясоедов Н.Ф.	805	Тюрин Ю.А.	680
Белова Е.В.	687	Козлов В.А.	629	Назаров В.Д.	703	Уткин О.В.	723
Беляков Н.А.	787	Козлов В.К.	713	Негоденко А.О.	743	Филатова Е.Н.	723
Бобынцев И.И.	805	Комиссаров А.Б.	655	Неофидов Н.А.	703	Фирстова В.В.	639
Бонда Н.А.	671	Коновалов П.Ш.	743	Новиков С.А.	703	Фрейлихман О.А.	648
Васильева А.Д.	655	Коновалова Н.И.	655	Павлюкова О.А.	743	Честков А.В.	750
Вебер В.Р.	787	Коровкина Е.С.	713	Пантелеев А.М.	787	Шаскольский Б.Л.	750
Викторов Д.В.	743	Костинов М.П.	713	Парилова О.В.	687	Шевченко А.В.	805
Галина Н.П.	779	Краковская А.В.	713	Персиянова Е.В.	695	Шемякин И.Г.	639
Го А.А.	763	Краснов В.С.	703	Петрова Н.П.	750	Ястребова Н.Е.	713
Грядун Д.А.	750	Кривицкая В.З.	763	Петрова П.А.	655	Bonovska M.	665
Даниленко Д.М.	655	Кричевская Г.И.	800	Петровская М.С.	800	Gnativ B.R.	811
Дементьева Е.И.	750	Крутецкая И.Ю.	703	Полибин Р.В.	779	Koren S.	773
Денисова Е.В.	800	Кубанов А.А.	750	Полищук В.Б.	713	Kovač M.	773
Дерябин Д.Г.	750	Кузнецова Е.В.	763	Преснякова Н.Б.	723	Najdenski H.	665
Дорофейчик-Дрыгина Н.А.	735	Куликова И.Г.	800	Прилепская Д.Р.	743	Petrova R.	665
Дрыгина Л.Б.	735	Кушнир Я.Б.	703	Савченко О.И.	671	Savova T.	665
Дятлов И.А.	639	Лапин С.В.	703	Сахарнов Н.А.	723	Sodja E.	773
Евлошенко Е.П.	703	Лейнсоо А.Т.	750	Свищева М.В.	805	Tokarevich N.K.	811
Еропкин М.Ю.	655	Лучинин Д.Н.	743	Сиволодский Е.П.	648	Toplak N.	773
Еропкина Е.М.	655	Львов Н.И.	763	Симакова А.И.	695	Tronin A.A.	811
Ефремова Н.Н.	805	Магаршак О.О.	713	Скоромец А.А.	703	Truden S.	773
Запорожец Т.С.	695	Майорова В.Г.	763	Скрынникова Е.А.	743	Valcheva V.	665
Зарипова А.З.	680	Максимчук В.К.	703	Сокотун С.А.	695	Žolnir-Dovč M.	773
Иванова А.А.	655	Макшаков Г.С.	703	Соминина А.А.	763		
Исаева Г.Ш.	680	Маркина А.Н.	687	Суркова Е.А.	703		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет	713	коклюш	779	туберкулез	787
антигенные свойства	655	комбинации антибиотиков	671	увеит	800
антимикробная резистентность	671	корь	779	уникальный фермент клебсиелл	
арбовирусы	743	лейкоциты	723	5-АСК декарбоксилаза	648
атрофический гастрит	735	летальный фактор	639	уровни экспрессии мРНК	723
аутоиммунитет	629	лихорадка Западного Нила	743	хромосомные мутации	750
биочип	750	лихорадка Калифорнийской серогруппы	743	хронические воспалительные заболевания легких	713
бронхиальная астма	713	лихорадка Синдбис	743	хронический верхнечелюстной синусит	687
вакцинация	779	лихорадка Укуниими	743	air temperature	811
вакцинопрофилактика	713	микробиота	805	CD4-лимфоциты	787
вакциноуправляемые инфекции	779	микробиоценоз	805	<i>Chlamydia trachomatis</i>	687
взрослые пациенты	763	микроорганизм	629	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	687
вирус Эпштейна–Барр	800	минеральный обмен	735	climate change	811
вирусные гепатиты	787	минимальная подавляющая концентрация	750	drug resistant tuberculosis	773
вирусы гриппа А(Н3N2)	655	негативная селекция Т-клеток в тимусе	629	<i>Haemophilus influenzae</i> типа b	713
ВИЧ-инфекция	787	низкая минеральная плотность костной ткани	735	IgA-протеазная активность	680
внутриклеточная бактериальная инфекция	687	носительство	680	IgG	713
ВЭБ-инфекционный мононуклеоз	723	олигоклональный IgG	703	IgM	713
ген <i>tetM</i>	750	остеокальцин	735	IL-6	800
генетические детерминанты резистентности	750	отеchnый фактор	639	IL-8	800
генетические свойства	655	охват прививками	779	Ion Torrent	773
гепатит В	779	позитивная селекция Т-клеток в тимусе	629	<i>Ixodes persulcatus</i>	811
гомеостатическая пролиферация	629	полимиксины	671	<i>Klebsiella kielensis</i>	648
грипп А(Н1N1)	763	пролиферативный синдром	800	<i>Klebsiella michiganensis</i>	648
грипп А(Н3N2)	763	протективный антиген	639	<i>Klebsiella oxytoca</i>	648
гриппозные вакцины	763	рассеянный склероз	703	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	671
дезинфектанты	671	реакция микронейтрализации	655, 763	Komi Republic	811
дезоксипридинолин	735	реакция торможения гемагглютинации	655, 763	microbiology	665
дети	680, 713	свободные легкие цепи иммуноглобулинов	703	mouflon	665
дисбиоз	805	своевременность вакцинации	779	MRZ-реакция	703
дифтерия	779	секвенирование гена <i>rpoB</i>	648	multidrug resistant tuberculosis	773
иксодовый клещевой боррелиоз	695	селанк	805	MUNANA-тест	655
иммобилизационный стресс	805	серологический мониторинг	743	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	773
иммунизация	779	серотипы	680	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	687
иммунная система	695	сигнальные пути апоптоза и выживания	723	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	750
иммунный ответ	687	специфические антитела	695	next-generation sequencing	773
иммунопатогенез	639	столбняк	779	paratuberculosis	665
индексы антител	703	тетрациклин	750	pathomorphology	665
интратекальный синтез иммуноглобулинов	703	токсин	639	PCR	665
инфекция	629	толерантность	629	phenotypic drug susceptibility testing	773
инфекция <i>H. pylori</i>	735			population	811
ИФА	743			<i>Streptococcus pneumoniae</i>	680, 713
карбапенемаза	671			tick-bite incidence	811
клеточный иммунный ответ	695			tick-borne encephalitis	811
коинфекция	787			tuberculosis	773