

2020

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Влияние Fc-фрагментов нормального иммуноглобулина G на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *Streptococcus pyogenes*, связывающими разные классы иммуноглобулинов» (авторы: Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян Артем А.) (с. 55–63)

Illustrations for the article “Impact of IgG Fc fragments on experimental glomerulonephritis induced by *Streptococcus pyogenes* strain binding various immunoglobulin classes” (authors: Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A.) (pp. 55–63)

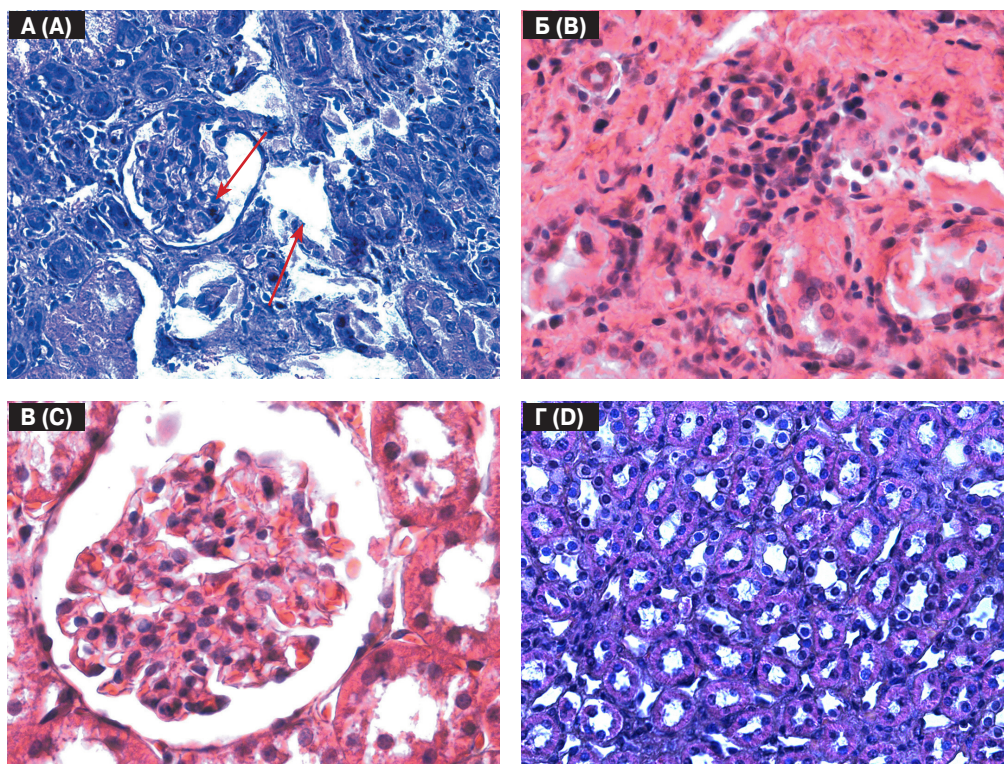


Рисунок. Морфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные *Streptococcus pyogenes* генотипа *emm1*

Figure. Morphological changes in cortex and medullar substances of the rabbit renal tissue induced by *Streptococcus pyogenes* of *emm1* genotype

A — полости капсул почечных клубочков резко расширены, в капиллярных петлях клубочков наблюдаются процессы некроза и атрофии, в стенке проксимальных канальцев коркового вещества выявляется десквамация эпителиальных клеток (стрелки); Б — выраженный отек и утолщение мембран стенки дистальных канальцев мозгового слоя с одновременным разрастанием рыхлой волокнистой интерстициальной ткани стромы; В, Г — отсутствие патоморфологических изменений в коре и мозговом веществе почки кролика, инъецированного Fc-фрагментом нормального IgG; А–Г — окраска гематоксилин-эозином, $\times 750$.

A — the capsular cavities of the glomeruli strongly expanded, in the capillary loops of the glomeruli the necrosis and atrophy are observed, in the wall of the proximal tubules of the cortex desquamation of epithelial cells is revealed (shown by arrows); B — swelling and thickening of the membranes of the wall of distal tubules in the medulla with the simultaneous proliferation of the fibrous interstitial tissue; C, D — absence of pathological changes in the cortex and the medulla of the kidney obtained from rabbits treated with Fc fragments of IgG; A–D — staining with hematoxylin-eosin. Magnification $\times 750$.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

январь–март

2020, том 10

№ 1

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
- Лоузи 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
- Фрейдли И.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Хайтов Р.М.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия
- Черешнев В.А.** д.м.н., профессор, академик РАН, 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.

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

January–March

2020, volume 10

No. 1

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 25.03.2020. 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, 2020

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2020

© SPb RAACI, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., Дедков В.Г.

ПЕРЕДОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕЯСНОЙ ЭТИОЛОГИИ 9

Старкова Д.А., Нарвская О.В.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
Mycobacterium avium subsp. hominissuis — ВОЗБУДИТЕЛЯ МИКОБАКТЕРИОЗА ЧЕЛОВЕКА** 26

Лапштаева А.В., Живечкова Е.А., Сычев И.В., Евсегнеева И.В., Новиков В.В.

**РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА,
ОБУСЛОВЛЕННОГО Mycobacterium tuberculosis** 35

Зорина В.Н.

СТРУКТУРА И ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ ГРИППА 49

Оригинальные статьи

Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян Артем А.

**ВЛИЯНИЕ Fc-ФРАГМЕНТОВ НОРМАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА G НА РАЗВИТИЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА,
ИНДУЦИРОВАННОГО ШТАММАМИ Streptococcus pyogenes, СВЯЗЫВАЮЩИМИ РАЗНЫЕ КЛАССЫ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ** 55

Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л., Ширшев С.В.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛОВ, ПРЕДОБРАБОТАННЫХ ГОРМОНАМИ, С БИОПЛЕНКАМИ
КОММЕНСАЛЬНОГО И УРОПАТОГЕННОГО ШТАММОВ Escherichia coli in vitro** 64

Шаньшин Д.В., Бакулина А.Ю., Казачинская Е.И., Пьянков С.А., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФРАГМЕНТОВ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА ВИРУСА ЗИКА С АНТИТЕЛАМИ
СЫВОРОТКИ ЛЮДЕЙ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ ФЛАВИВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ** 73

Семакова А.П., Германчук В.Г., Рогожин В.В., Шавина Н.Ю., Овчинникова М.В., Кириллова Т.Ю.,
Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И.

**АНЕСТЕЗИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ** 83

Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Морозова Н.С., Михайлова Ю.М., Иванова О.Е., Козловская Л.И.,
Еремеева Т.П., Гмыль А.П., Короткова Е.А., Байкова О.Ю., Красота А.Ю., Иваненко А.В., Ярмольская М.С.,
Ковальчук И.В., Романенко Е.Н.

**ОТВЕТНЫЕ МЕРЫ ПО ПРОТИВОДЕЙСТВИЮ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ПОЛИОМИЕЛИТА
ВАКЦИННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ТИПА 2 В РОССИИ В 2016 г.** 90

Егорова С.А., Кулешов К.В., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ
СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ S. typhimurium, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2005–2018 гг. В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ** 99

Комбарова С.Ю., Бичучер А.М., Солдатский Ю.Л., Юнусова Р.Ю., Скирда Т.А., Мартыненко И.Г., Головина Л.И.,
Эдгем С.Р., Северин Т.В., Мельников В.Г.

**ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК МЕНИНГОКОККА, ПНЕВМОКОККА, ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ И СТРЕПТОКОККА
ГРУППЫ A В БИОПТАТАХ АДЕНОИДОВ У ДЕТЕЙ** 111

Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н., Данилова Е.М., Беспалова Г.И.

**ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СТРЕПТОКОККОВ И КЛЕБСИЕЛЛ
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ
РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА** 121

Костинов М.П., Филатов Н.Н., Журавлев П.И., Гладкова Л.С., Полищук В.Б., Шмицько А.Д., Пахомов Д.В., Хромова Е.А., Васильева Г.В., Тихонова И.А., Рыжов А.А., Благовидов Д.А., Костинова А.М.

УРОВЕНЬ КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КОРИ У СОТРУДНИКОВ ОТДЕЛЬНОЙ БОЛЬНИЦЫ В РАМКАХ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ 129

Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г.

ФОРМИРОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА НА КОРЕВУЮ ВАКЦИНУ У ВЗРОСЛЫХ 137

Зайнетдинова Л.Ф., Телешева Л.Ф., Коряушкина А.В.

ОСОБЕННОСТИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ И ГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ 145

Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Терновой В.А., Локтев В.Б.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ЛИХОРАДКИ КЕМЕРОВО В ТАЕЖНЫХ КЛЕЩАХ, СОБРАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ 159

Аминов Р.Ф., Фролов А.К., Федотов Е.Р.

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ СОСТАВ КРОВИ, ГЕМОГРАММА, МОРФОМЕТРИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ И ТЕЛА КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СЛЮНЫ *HIRUDO VERBANA* 167

Краткие сообщения

Панферова Ю.А., Ваганова А.Н., Фрейлихман О.А., Третьяков К.А., Медведев С.Г., Шапарь А.О., Токаревич Н.К.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO* У КРОВОСОСУЩИХ КЛЕЩЕЙ В ПАРКОВЫХ ЗОНАХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА 175

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В., Зобова С.Н.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЛЕКТИНОВОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА (МАННОЗОСВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА И ФИКОЛИНА) КАК ФАКТОР РИСКА ХРОНИЧЕСКОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ *SagA* ШТАММОМ БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI* У ПОДРОСТКОВ 180

Смирнова О.В., Сняжков А.А.

ВЛИЯНИЕ *HELICOBACTER PYLORI* НА ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АТРОФИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ 187

Андреянов О.Н.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ХИЩНЫХ ЖИВОТНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕМ *ESCHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* В СРЕДНЕЙ ПОЛОСЕ РОССИИ 193

Правила для авторов 197

Авторский указатель 200

Предметный указатель 200

CONTENTS

Reviews

Khafizov K.F., Speranskaya A.S., Matsvay A.D., Shipulin G.A., Dedkov V.G.

ADVANCED TECHNOLOGIES IN DIAGNOSTICS OF VIRAL DISEASES OF UNKNOWN ETIOLOGY 9

Starkova D.A., Narvskaya O.V.

GENETIC DETERMINANTS OF VIRULENCE AND DRUG RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *HOMINISSUIS* – A CAUSATIVE AGENT OF MYCOBACTERIOSIS IN HUMANS 26

Lapshtaeva A.V., Zhivechkova E.A., Sychev I.V., Evsegneeveva I.V., Novikov V.V.

INNATE IMMUNE RECEPTORS IN DEVELOPMENT OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* INFECTION 35

Zorina V.N.

PATTERN OF LACTOFERRIN ANTI-INFLUENZA VIRUS INHIBITORY ACTIVITY 49

Original articles

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A.

IMPACT OF IgG Fc-FRAGMENTS ON EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS INDUCED BY *STREPTOCOCCUS PYOGENES* STRAIN BINDING VARIOUS IMMUNOGLOBULIN CLASSES 55

Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Orlova E.G., Gorbunova O.L., Shirshov S.V.

IN VITRO INTERACTION OF HORMONE-CONDITIONED NEUTROPHILS WITH COMMENSAL AND UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* BIOFILMS 64

Shanshin D.V., Bakulina A.Yu., Kazachinskaja E.I., Pyankov S.A., Ilyichev A.A., Scherbakov D.N.

AN INTERACTION OF ZIKA VIRUS ENVELOPE FRAGMENTS WITH SERUM ANTIBODIES DERIVED FROM SUBJECTS AFTER FLAVIVIRUS INFECTIONS 73

Semakova A.P., Germanchuk V.G., Rogozhin V.V., Shavina N.Yu., Ovchinnikova M.V., Kirillova T.Yu., Livanova L.F., Belyakova N.I.

ANESTHESIA OF LABORATORY ANIMALS IN MANUFACTURING OF DIAGNOSTIC AND PREVENTIVE BIOMEDICINES 83

Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Morozova N.S., Mikhailova Yu.M., Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I., Ereemeeva T.P., Gmyl A.P., Korotkova E.A., Baykova O.Yu., Krasota A.Yu., Ivanenko A.V., Yarmolskaya M.S., Kovalchuk I.V., Romanenko E.N.

MEASURES COUNTERACTING 2016 SPREAD OF VACCINE-DERIVED POLIOMYELITIS VIRUS TYPE 2 IN RUSSIAN FEDERATION 90

Egorova S.A., Kuleshov K.V., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N.

THE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY, RESISTANCE MECHANISMS AND PHYLOGENETIC STRUCTURE OF *S. TYPHI* ISOLATED IN 2005–2018 IN THE RUSSIAN FEDERATION 99

Kombarova S.Yu., Bichucher A.M., Soldatsky Yu.L., Yunusova R.Yu., Skirda T.A., Martynenko I.G., Golovina L.I., Edgem S.R., Severin T.V., Melnikov V.G.

DETECTION OF MENINGOCOCCUS, PNEUMOCOCCUS, *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*, AND GROUP A *STREPTOCOCCUS* DNA IN PEDIATRIC ADENOID BIOPATS 111

Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M., Bespalova G.I.

THE IMPORTANCE OF PATHOGENICITY FACTORS OF SOME *STREPTOCOCCUS* spp. AND *KLEBSIELLA* spp. IN DETERMINING THEIR ETIOLOGICAL ROLE IN THE INFLAMMATORY PROCESSES OF THE RESPIRATORY TRACT 121

Kostinov M.P., Filatov N.N., Zhuravlev P.I., Gladkova L.S., Polischuk V.B., Shmitko A.D., Pakhomov D.V., Khromova E.A., Vasilyeva G.V., Tikhonova I.A., Ryzhov A.A., Blagovidov D.A., Kostinova A.M.

LEVEL OF MEASLES HERD IMMUNITY ASSESSED IN HOSPITAL MEDICAL WORKERS WITHIN A FRAMEWORK OF THE STATE MEASLES ELIMINATION PROGRAM 129

<i>Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Zetkin A.Yu., Klykova T.G.</i>	
FORMATION OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY TO MEASLES VACCINE IN ADULTS	137
<i>Zaynetdinova L.F., Telesheva L.F., Koryaushkina A.V.</i>	
FEATURES OF LOCAL IMMUNITY IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS AND GENITAL INFECTION	145
<i>Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Yu.I., Ternovoi V.A., Loktev V.B.</i>	
GENOTYPING OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND KEMEROVO VIRUSES IN TAIGA TICKS COLLECTED IN THE KOMI REPUBLIC	159
<i>Aminov R.F., Frolov A.K., Fedotov Ye.R.</i>	
RAT PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE SUBSET COMPOSITION, HEMOGRAM, LYMPHOID ORGAN AND BODY MORPHOMETRY AFTER EXPOSURE TO BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES DERIVED FROM <i>HIRUDO VERBANA</i> SALIVA	167
Short communications	
<i>Panferova Yu.A., Vaganova A.N., Freylikhman O.A., Tretyakov K.A., Medvedev S.G., Shapar' A.O., Tokarevich N.K.</i>	
PREVALENCE OF <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> SENSU LATO GENETIC MARKERS IN BLOOD-SUCKING TICKS IN SUBURBAN PARK ZONES IN SAINT PETERSBURG	175
<i>Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V., Zoboova S.N.,</i>	
COMPLEMENT ACTIVATION LECTIN PATHWAY (MANNOSE-BINDING LECTIN AND FICOLIN) GENES POLYMORPHISM AS THE RISK FACTOR OF <i>CagA</i> POSITIVE CHRONIC <i>HELICOBACTER PYLORI</i> INFECTION IN ADOLESCENTS	180
<i>Smirnova O.V., Sinyakov A.A.</i>	
INFLUENCE OF <i>HELICOBACTER PYLORI</i> ON CYTOKINE REGULATION IN CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS	187
<i>Andreyanov O.N.</i>	
EXAMINING <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS</i> INFECTION IN SOME MIDLAND RUSSIA PREDATORY ANIMAL SPECIES	193
Instructions to Authors	197
Author index	197
Subject index	200

ПЕРЕДОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕЯСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

К.Ф. Хафизов^{1,4}, А.С. Сперанская^{1,2}, А.Д. Мацвай^{1,3}, Г.А. Шипулин⁴, В.Г. Дедков^{5,6}

¹ ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Московская область, Россия

⁴ ФГБУ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью МЗ РФ, Москва, Россия

⁵ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт Петербург, Россия

⁶ Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва, Россия

Резюме. Расшифровка инфекционных заболеваний неясной этиологии является одной из актуальных проблем современной медицины, потому как получение лабораторно подтвержденного диагноза, к сожалению, удастся осуществить лишь в весьма небольшой доле случаев таких заболеваний. Так как большая часть часто встречающихся в средних широтах инфекционных заболеваний имеет характерную выраженную клиническую картину, до недавнего времени этой проблеме не уделялось должного внимания. Возрастание числа случаев инфекционных заболеваний, не характеризующихся идентифицируемым набором клинических признаков, наблюдаемое в последнее время, заставляет рассматривать проблему более пристально. Считается, что такая тенденция обусловлена рядом обстоятельств, включая ослабление санитарного контроля территорий, усиление миграционных потоков, как внутренних, так и внешних, отказ от вакцинации на фоне длительного периода эпидемического благополучия, возникновение атипичных штаммов бактерий как следствие нерациональной антибиотикотерапии, и другие. Вирусы являются наиболее распространенными организмами на нашей планете, что обуславливает ведущую роль инфекционных агентов вирусной природы в структуре инфекционных заболеваний неясной этиологии. По некоторым оценкам, полученным методами математического моделирования, существует не менее 320 000 видов вирусов, способных к инфицированию млекопитающих, большая часть которых еще не описана. Поэтому мониторинг циркуляции известных вирусных патогенов, отслеживание путей их распространения, эволюции и изменений нуклеотидной последовательности их геномов, а также выявление новых видов вирусов становятся жизненно важными аспектами эпидемиологического надзора, необходимыми для своевременного реагирования на возникающие угрозы, прогнозирования и раннего выявления вспышек вирусных заболеваний человека и животных. В представленном обзоре рассматриваются как традиционные молекулярно-генетические методы выявления вирусных патогенов, такие как методы ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сенгеру с предварительным клонированием, так и методы, основанные на применении секвенирования второго и третьего поколений. В связи с тем, что исследование вирусных инфекционных агентов с помощью технологий высокопроизводительного секвенирования NGS (англ. Next Generation Sequencing) на сегодняшний день приобретает все большее практическое значение для диагностики, бор-

Адрес для переписки:

Хафизов Камилль Фаридович
111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, 3а,
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 917 597-20-85 (моб.).
E-mail: kkhafizov@gmail.com

Contacts:

Kamil F. Khafizov
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireevskaya str. 3a,
Central Research Institute of Epidemiology.
Phone: +7 917 597-20-85 (mobile).
E-mail: kkhafizov@gmail.com

Библиографическое описание:

Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., Дедков В.Г.
Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной
этиологии // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 9–25.
doi: 10.15789/2220-7619-ATI-824

Citation:

Khafizov K.F., Speranskaya A.S., Matsvay A.D., Shipulin G.A., Dedkov V.G.
Advanced technologies in diagnostics of viral diseases of unknown etiology //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020,
vol. 10, no. 1, pp. 9–25. doi: 10.15789/2220-7619-ATI-824

Работа поддержана грантом РНФ №17-74-20096.

бы с болезнями, молекулярной эпидемиологии и инфекционного контроля, более подробное рассмотрение получили различные методы, основанные на применении этих технологий. Особое место было также отведено подходам, применяющимся для обогащения вирусного генетического материала в образцах с низким содержанием нуклеиновых кислот патогена.

Ключевые слова: вирусы, диагностика, неизвестная этиология, инфекционные заболевания, молекулярная генетика, NGS, секвенирование, ПЦР, обогащение.

ADVANCED TECHNOLOGIES IN DIAGNOSTICS OF VIRAL DISEASES OF UNKNOWN ETIOLOGY

Khafizov K.F.^{a,d}, Speranskaya A.S.^{a,b}, Matsvay A.D.^{a,c}, Shipulin G.A.^d, Dedkov V.G.^{e,f}

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

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

^d Center of Strategic Planning of the Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

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

^f Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. Unveiling origin of infectious diseases with unknown etiology is one of the major issues in contemporary medicine, since a laboratory-confirmed diagnosis may, unfortunately, be obtained solely in very few cases. Because the majority of the most common mid-latitude infections display a typical overt clinical picture, this problem has not been paid a proper attention until recently. Recent rise in incidence rate of infectious diseases lacking typical clinical signs observed lately makes it extremely important to consider the problem more closely. It is believed that such trend is due to a whole body of reasons, including impaired sanitary control, increased both internal and external migration flows, refusal of vaccination in case of long-lasting epidemic wellbeing, emergence of atypical bacterial strains of bacteria resulting from irrational antibiotic therapy etc. Viruses constitute the largest group of organisms on our planet accounting for them as the most common causative agent of infectious diseases of unknown etiology. Some estimates obtained by mathematical modeling propose that at least 320,000 types of viruses capable of infecting mammals may exist, most of which have not been described yet. Hence, monitoring circulation of the known viral pathogens, tracing down their spreading and changes in genome nucleotide sequence as well as revealing new types of viruses become important aspects of epidemiological surveillance necessary for timely response to emerging threats, prediction and early detection of outbreaks both in humans and animals. This review summarizes traditional molecular genetics methods for detection of viral pathogens, such as PCR, real-time PCR, Sanger sequencing with pre-cloning, and methods based on the second and third generation sequencing. Therefore, a more detailed overview was provided to diverse methods based on using such technologies because viral infectious agents investigated with high-throughput sequencing (or NGS — Next Generation Sequencing) has been increasingly appreciated as feasible for diagnostics, disease control, molecular epidemiology and infection control. Finally, a special attention was also paid to the approaches used to enrich the viral genetic material in samples containing low amount of pathogen nucleic acids.

Key words: viruses, diagnostics, unknown etiology, infectious diseases, molecular genetics, NGS, sequencing, PCR, enrichment.

Введение

Расшифровка случаев инфекционных заболеваний неясной этиологии является актуальной проблемой современной медицины. К сожалению, лишь в весьма небольшой доле случаев таких заболеваний удается получить лабораторно подтвержденный диагноз. До недавнего времени этой проблеме не уделялось достаточного внимания в связи с тем, что большая часть наиболее часто встречающихся в средних широтах инфекционных заболеваний имеет выраженную клиническую картину с хорошо различимой патогномоничной симптоматикой. Однако в последние годы наблюдается рост случаев инфекционных заболеваний, не имеющих характерной клинической картины. В частности, большинство трансмиссивных заболеваний вирусной этиологии в большинстве своем имеют сходное клиническое течение, особенно

на начальном этапе заболевания. В качестве примера можно привести лихорадку Зика, сходную по клиническим проявлениям с лихорадкой денге и лихорадкой Чикунгунья. Первые два заболевания обусловлены флавивирусами, тогда как лихорадка Чикунгунья вызывается представителем рода *Alphavirus*. При этом природные очаги циркуляции, а также переносчики для всех трех вирусов одинаковы [50]. Такая тенденция обусловлена рядом обстоятельств: ослаблением санитарного контроля территорий, усилением миграционных потоков, как внутренних, так и внешних, отказом от вакцинации на фоне длительного периода эпидемического благополучия, возникновением атипичных штаммов бактерий вследствие нерациональной антибиотикотерапии и пр. В этих условиях качество диагностики инфекционных заболеваний и организация надзора за ними находятся в зависимости от уровня развития

лабораторной службы и способности проводить диагностику с помощью современных молекулярных методов.

В структуре инфекционных заболеваний неясной этиологии ведущую роль играют инфекционные агенты вирусной природы. Это обстоятельство связано с тем, что вирусы являются наиболее распространенным источником генетического материала на Земле, вероятно инфицируя все клеточные организмы. Высокая изменчивость геномов вирусов и способность адаптироваться к новым хозяевам, в сочетании с климатическими изменениями, а также изменяющийся характер хозяйственной деятельности человека и процессы глобализации способствуют возникновению эмерджентных вспышек вирусных инфекций, обусловленных как вновь возникающими, так и редкими либо нехарактерными для данной территории видами вирусов [48]. Многие специалисты считают, что мы знаем о вирусах меньше, чем о любой другой группе организмов. Вероятно на сегодняшний день охарактеризована всего лишь доля одного процента от всех вирусов [34]. Согласно данным математического моделирования существует не менее 320 000 видов вирусов млекопитающих, большая часть которых еще не описана [18]. Все они потенциально являются возбудителями инфекционных заболеваний человека и животных. В связи с этим выявление новых видов вирусов, мониторинг циркуляции известных вирусов и оценка путей их распространения являются одним из жизненно важных аспектов дозорного эпидемиологического надзора, проводимого с целью своевременного реагирования на вновь возникающие угрозы, прогнозирования и раннего выявления вспышек вирусных заболеваний человека и животных.

Традиционные методы диагностики инфекционных агентов

До наступления эры молекулярных исследований выявление новых возбудителей базировалось на использовании классических методов микробиологии и вирусологии, в том числе накоплении бактерий и вирусов на культуральных средах, клеточных линиях и лабораторных животных с последующим определением их антигенных и патогенных свойств, особенностей метаболизма, а также фенотипических особенностей на основе данных микроскопических исследований.

Появление приборов для автоматического капиллярного секвенирования в сочетании с развитием методик молекулярного клонирования расширили возможности по определению новых патогенных микроорганизмов. Суть данных методов состояла в амплифика-

ции тотальной ДНК (либо кДНК в случае РНК-содержащих вирусов) с последующим молекулярным клонированием полученных библиотек и анализе большого количества индивидуальных клонов методом капиллярного секвенирования в надежде получить последовательности нового микроорганизма. В других случаях для исследований использовался метод гибридизационного анализа с помощью ДНК-чипов, на которых иммобилизованы олигонуклеотиды, соответствующие консервативным участкам большого количества видов вирусов. При этом исследователи сталкивались с двумя основными проблемами: во-первых, относительно низкое содержание генетического материала вируса в исследуемом материале и, во-вторых, высокий процент нуклеиновых кислот человека и нормофлоры в клиническом материале. В тех случаях, когда не удавалось увеличить количество вирусных частиц за счет культивирования *in vitro*, эти задачи решались с использованием физических и химико-ферментативных методов. С этой целью на начальном этапе исследуемый образец фильтровали и концентрировали методом ультрацентрифугирования. Далее следовала стадия обработки экзонуклеазами, что позволяло избавиться от высокомолекулярной геномной ДНК и РНК хозяина. Считалось, что генетический материал, заключенный в вирусную оболочку, при этом остается интактным. После этапа предварительной обработки следовал этап выделения нуклеиновых кислот, лигирование с олигонуклеотидными адаптерами и амплификация материала, обогащенного вирусной ДНК (или РНК) с помощью ПЦР (или ОТ-ПЦР) для получения библиотек.

Было разработано несколько альтернативных подходов для идентификации генетического материала инфекционных агентов и определения последовательностей их геномов. К числу таких подходов следует отнести метод SISPA (Sequence-Independent Single Primer Amplification), а также различные его модификации [5, 6, 7, 8, 9]. Еще один метод, оптимизированный для задач виромтики и названный VIDISCA, основан на принципе AFLP [4, 106].

Другим направлением развития методик выявления неизвестных патогенов стала универсальная ПЦР (broad-range PCR), основанная на амплификации небольших консервативных фрагментов вирусных геномов с помощью праймеров, специфических для всех представителей данного рода (реже семейства) вирусов. Полученный продукт амплификации анализировался методом капиллярного секвенирования напрямую, либо после этапа молекулярного клонирования. Универсальная ПЦР была успешно использована для изучения биоразнообразия [5, 109] и идентификации новых эмер-

джентных патогенов [27], но этот подход все же характеризуется низкой чувствительностью, сложностью и длительностью выполнения, отсутствием универсальности и невозможностью стандартизации. Кроме того интерпретация таких результатов в клинической лаборатории может быть заметно затруднена, потому описанные подходы выявления неизвестных вирусных агентов не получили широкого применения в практической лабораторной диагностике.

Не вызывает сомнения тот факт, что наиболее удобным, дешевым и результативным методом лабораторной диагностики инфекционных заболеваний является метод ПЦР в реальном времени (Real Time PCR) с использованием специфических праймеров и ДНК-зондов. Этот подход уже довольно долго и успешно [104] используется как для исследования представителей отдельных вирусных родов, так и при анализе разнообразия вирусов в различных типах биологического материала [11, 12, 13]. На настоящее время описано значительное количество праймеров, предназначенных для обнаружения определенных вирусных видов [15, 16, 17]. Однако их невозможно использовать в мультиплексных реакциях из-за различных температур отжига праймеров, неспецифической амплификации и потенциальной самокомплементарности. Таким образом, для видового определения вирусов разных родов необходимо проводить ряд экспериментов ПЦР. Во многих случаях также бывает сложно очертить возможный круг инфекционных агентов, которые могли послужить причиной данного заболевания. Таким образом, для проведения исследований методом специфической ПЦР требуется предварительная гипотеза о наличии конкретных вирусов в образце, в отсутствие которой процесс идентификации патогенов может занять значительное время, что накладывает ограничение на выбор тактики лечения и снижает эффективность противоэпидемических мероприятий. Кроме того, большинство диагностических лабораторий имеет довольно ограниченный спектр наборов, позволяющих выявлять лишь очень небольшое количество инфекционных агентов, наиболее часто встречающихся на данной территории.

Технологии массового параллельного секвенирования для изучения вирусных патогенов

Появление технологий массового параллельного секвенирования (или как их часто называют — NGS, Next Generation Sequencing) вызвало настоящую революцию в самых различных областях медицины и биологии. Вирусология

не осталась в стороне и также получила существенный толчок в развитии благодаря возможности обнаруживать новые патогены и прочитывать вирусные геномы целиком. Так, полногеномное секвенирование (WGS, Whole Genome Sequencing) вирусов становится все более важным не только для фундаментальных исследований, но и для клинической науки и, в перспективе, медицинской диагностики. В вирусологии этот подход уже получил серьезную роль в разработке новых методов лечения и вакцин, а также для расширения возможностей молекулярной эпидемиологии и эволюционной геномики [41].

В то время как большинство экспериментов по секвенированию бактериальных геномов в настоящее время осуществляется на клинических изолятах, которые проходят этап предварительного культивирования, и таким образом их пробоподготовка для NGS сравнительно проста, изучение вирусных нуклеиновых кислот, будь то выделенных из культуральных сред или непосредственно из клинических образцов, практически всегда осложняется наличием контаминационной (загрязняющей) ДНК-хозяина [65]. Чтобы решить эту проблему, изучение геномов вирусов может проводиться как путем ультраглубокого секвенирования, так и обогащением нуклеиновых кислот вирусов перед секвенированием. Последнее может осуществляться либо напрямую, либо же путем концентрации вирусных частиц. При этом все эти подходы имеют свои собственные издержки и сложности.

Так, широко распространен метагеномный подход, позволяющий обнаруживать различные вирусные патогены с использованием так называемого «шот-ган» (англ. «shot-gun») секвенирования [20, 21, 22], который все более активно применяется для выявления патогенов и для характеристики микробного разнообразия в экологических и клинических образцах [72, 105]. Однако, несмотря на постоянное снижение стоимости прочтения ДНК (https://www.genome.gov/images/content/costpermb_2017.jpg), этот способ все еще достаточно дорог и нецелесообразен для скрининга большого количества образцов. Метагеномный подход отличается тем, что для подготовки библиотек используют препараты тотальной ДНК/РНК, выделенные из образцов. Такие препараты содержат нуклеиновые кислоты не только целевого организма, но также хозяина и контаминантных примесей (бактерий, грибов и т.п.). Прямое «шот-ган» секвенирование таких образцов (без предварительной деплеции нежелательных примесей) приводит к генерации данных, преимущественно состоящих из последовательностей, относящихся к геномам хозяина и/или других организмов

[65], и лишь с крайне незначительной долей последовательностей искомым вирусных патогенов, что заметно снижает чувствительность эксперимента. В связи с тем, что до начала эксперимента часто даже приблизительная доля содержимого патогена неизвестна, практически невозможно оценить, сколько всего прочтений потребуется на один образец, чтобы гарантированно обнаружить патоген в файле с «сырыми» данными секвенирования. Так, доля прочтений, которые соответствуют геному целевого вируса в результатах метагеномного секвенирования, часто весьма низка; например, 0,008% для вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) в крови здорового взрослого [2], 0,0003% для вируса Ласса в клинических образцах [66] и 0,3% для вируса Зика в образце, который был обогащен посредством фильтрации и центрифугирования [14]. Наши собственные эксперименты по секвенированию транскриптомных библиотек, полученных от птиц и клещей, также во многом подтверждают эти данные. Например, содержание вирусных прочтений в образцах с калифорнийским энцефалитом обычно в пределах 0,03–0,06%, в образце с вирусом Вад-Медани — 0,7%, авиаденовирусом — 0,1%, авастровирусом — 0,02% и коронавирусом — 0,0001%. При этом в ряде случаев мы вообще не смогли найти вирусные прочтения в результатах секвенирования биоматериала, в котором наличие вируса было точно подтверждено с использованием специализированных родоспецифичных праймеров, а общее число прочтений в «fastq»-файлах достигало одного миллиона. Отдельно стоит упомянуть и про различные наборы для выделения вирусной ДНК/РНК. Наши эксперименты (неопубликованные данные) по сравнению различных наборов и методик показали, что количество получаемых вирусных прочтений может отличаться на порядки для одних и тех же образцов, вновь показывая, что результаты, получаемые в разных лабораториях, могут очень сильно различаться.

Глубина покрытия при такого рода экспериментах также обычно совершенно недостаточна для обнаружения мутаций резистентности к лекарственным препаратам [99], а стоимость подобных исследований высока. Таким образом, метагеномное секвенирование обычно проводится только на небольшом количестве образцов для исследовательских целей [2, 14]. Широко известны такие подходы как концентрация вирусных частиц из клинических образцов путем опосредованного сдерживания антителами, фильтрация, ультрацентрифугирование и деплеция свободных нуклеиновых кислот, принадлежащих в основном хозяину [54, 60, 77, 91], и хотя они могут повысить процент вирусных последовательностей, однако они также значи-

тельно уменьшают общее количество вирусных нуклеиновых кислот, что часто приводит к ситуациям, когда количество ДНК патогена будет недостаточно для подготовки библиотеки для секвенирования. Кроме того, все эти методы заметно увеличивают стоимость и длительность исследования. Неспецифические методы амплификации, такие как амплификация с множественным вытеснением цепи (MDA, Multiple Displacement Amplification), использующая случайные праймеры и полимеразу Ф29, могут увеличивать выход ДНК, но эти подходы требуют дополнительного времени, финансовых затрат и приводят к неравномерной представленности фрагментов, ошибкам и загрязнению, не обязательно улучшая чувствительность [46, 88]. Более того, доля прочтений хозяина часто все еще остается высокой [21].

Когда метагеномные подходы используются для обнаружения или диагностики патогенов, крайне важно использовать соответствующие биоинформационные инструменты и базы данных, которые помогут оценить являются ли обнаруженные патогенные последовательности причинами инфекции, случайными находками или контаминацией. Сопутствующий биоинформационный анализ объемных метагеномных данных обычно требует значительных вычислительных ресурсов, а также определенных знаний и опыта по работе со средствами анализа. Как правило, сам анализ заключается в попарном сравнении полученных последовательностей с теми что хранятся в базах данных, для чего используются различные программные средства, среди которых наиболее популярен BLAST [3], хотя существуют и другие программы [6].

Что касается опубликованных биоинформатических пайплайнов для анализа данных с целью поиска вирусных патогенов, то они, как правило, делятся на две категории: 1) те, что первоначально удаляют прочтения «хозяина» путем точного выравнивания на соответствующий хозяйский геном, и в дальнейшем анализ идет уже только для оставшихся «нехозяйских» прочтений; 2) те, что производят сборку прочтений до более длинных контигов, а затем последние уже анализируются на предмет принадлежности к какому-либо организму, включая вирусные. Однако у первого подхода имеется один существенный недостаток — он подходит только для тех случаев, когда хозяином выступают хорошо изученные организмы с хорошо охарактеризованными геномами, такие как, например, человек или мышь. Впрочем, с развитием технологий секвенирования все больше полных геномов становятся доступными публично, и эта проблема постепенно уходит в прошлое. У второго подхода тоже есть свой не-

достаток — для сборки длинных контигов требуется высокое покрытие, что существенно увеличивает как время анализа, так и стоимость эксперимента. При недостаточном количестве данных возможны пробелы между прочтениями, и контиги часто не могут быть построены, в конечном счете, мешая идентификации вирусов. Впрочем, общее у обоих подходов — все прочтения-кандидаты («выжившие» после фильтрации хозяйской ДНК в подходе первого типа, или «удлиненные» прочтения при втором подходе) сравниваются с известными вирусными последовательностями. Среди опубликованных пайплайнов первого типа можно перечислить подход Petty и соавт. [55], в котором необработанные прочтения сначала сопоставляются с человеческим референсным геномом, а оставшиеся затем сравниваются с вирусной базой данных. Удаление хозяйских прочтений является важным шагом и было реализовано в VirusFinder [107], VirusHunter [113], VirusSeq [16] и Vy-PER [103]. Отдельно стоит упомянуть, что если хозяйские прочтения остаются в анализируемых данных, то могут возникнуть ложноположительные результаты за счет возможного высокого сходства с вирусными геномами. VirusFinder [107] сначала выполняет этап предварительной обработки, в котором сырые прочтения выравниваются на человеческий геном с использованием Bowtie2 [58, 59]. Затем оставшиеся прочтения выравниваются на вирусную базу данных с использованием BLAT [51]. Наконец, предположительно вирусные прочтения собираются до более длинных контигов с использованием Trinity [37]. VirusFinder предполагает высокую глубину секвенирования, чтобы можно было получать хорошие результаты сборки, и в основном разрабатывался для обнаружения сайтов интеграции вирусов в геноме человека. Примеры, представленные в статье VirusFinder, имеют глубину секвенирования от 31X до 121X. Собранные контиги затем используются для построения филогенетических деревьев и оценки взаимосвязи друг с другом. VirusHunter [113] использует BLASTn для первоначальной фильтрации прочтений, принадлежащих хосту, после некоторой оценки качества. Оставшиеся прочтения затем классифицируются с использованием BLASTn и BLASTx в таксономические группы. Таким образом, VirusHunter нуждается в исходном геноме хозяина хорошего качества, чтобы разделить прочтения на хозяйские и нехозяйские. Кроме того, повторный запуск BLAST для обработки данных потребует времени. VirusSeq [16] сфокусирован на идентификации вирусных штаммов в раковой ткани человека. Сначала все прочтения человеческой ДНК удаляются путем сопоставления с человеческим геномом,

и оставшиеся прочтения затем выравниваются на вирусную базу данных, с использованием программы MOSAIK на обоих этапах [61]. VirusSeq использует подсчет общего количества прочтений для идентификации вирусного штамма. Тем не менее, пороговое значение установлено как 1000 прочтений на вирус в отношении 30-кратного покрытия вирусного генома. Этот порог может быть изменен, но VirusSeq разработан именно для образцов с высоким значением глубины прочтения, поэтому он не может использоваться для анализа наборов данных с низким процентным содержанием вирусного материала. Vy-PER [103] использует на первом этапе человеческий геном для удаления прочтений хозяйской ДНК. Прочтения, которые не выравниваются на человеческий геном, затем сравниваются с базой данных вирусных геномов NCBI с использованием BLAT [51]. Описанный пример на образцах лейкемии выполняется с довольно высокой глубиной (80X для случаев и 40X для контролей), что не является обязательным требованием, но важной предпосылкой для устранения ложных результатов.

Все упомянутые пайплайны второй категории для выравниваний используют программные средства, такие как Blast или Bowtie2. Более полный обзор доступных программ приведен в работе Fonseca и соавт. [32]. В случае обнаружения вируса определенную роль играют специфические проблемы: 1) высокая гетерогенность геномов; 2) скорость мутаций; 3) вставки целых геномных областей и 4) заражение новых хозяев адаптацией вирусного генома. Следовательно, возникают проблемы при обращении с образцами из большого разнообразия потенциально инфицированными вирусами видами. Во-первых, полностью собранный референсный геном доступен только для небольшого количества животных, хотя эта ситуация постепенно меняется. Кроме того, качество референсных геномов может различаться. Во-вторых, количество вирусной ДНК, читаемой в биологическом образце, зависит от производственного цикла вируса, временной точки заражения и выбора правильного типа ткани, чтобы получить большую часть вируса из образца. Следовательно, количество возможных детектируемых вирусных последовательностей может быть низким. Для построения контигов должно быть доступно множество прочтений вирусной последовательности, то есть должен быть обеспечен хороший охват, и эти чтения не должны быть загрязнены последовательностями из организма-хозяина и других микроорганизмов.

В любом случае, при анализе отдельно стоит вопрос наличия качественных баз данных аннотированных последовательностей. Существуют

куруемые вручную специализированные БД вирусных последовательностей, такие как, например, ViPR [81], RVDB [36], viruSITE [98] и другие (обширный список может быть найден по адресу [44]), однако они в основном содержат весьма ограниченное число информации, и не могут использоваться для поиска и идентификации патогенов, особенно новых и неизвестных. Напротив, наиболее обширная база NCBI GenBank содержит очень большое количество вирусных последовательностей, в том числе геномных фрагментов, и при этом постоянно пополняется, однако качество хранимой информации вызывает серьезные вопросы. Впрочем, даже эта база данных очень далека от того, чтобы считаться исчерпывающей в части охвата вирусного генетического материала.

Проблемы метагеномного NGS подхода для исследования вирусов

Метагеномика не требует предварительной гипотезы о наличии конкретного вирусного патогена, и это является значительным преимуществом подхода [99], поскольку позволяет секвенировать новые вирусы без необходимости разработки и синтеза специализированных праймеров или ДНК-зондов. Это особенно актуально для быстрого реагирования на возникающие угрозы, такие как вирус Зика [70]. Для вирусов, ассоциированных с развитием рака, метагеномика может помочь при оказании клинической помощи, предоставлять информацию о развитии заболевания и генерировать данные с высоким охватом интегрированных вирусных геномов [23]. Однако случайные находки как в хозяйской, так и в микробиологических последовательностях могут также представлять определенные этические и даже диагностические дилеммы для клинической метагеномики [39]. Имеет место и тот факт, что на сегодняшний день основное влияние метагеномики было на расширение разнообразия существующих семей, а не на определение новых, в связи с чем наблюдаются определенные ограничения такого подхода для изучения неизвестных ранее патогенов. На практике очень вероятно ситуация, при которой по результатам метагеномного секвенирования прочтения вирусной ДНК могут находиться в файле с данными, но не обнаруживаться путем сравнения с записями в базе данных из-за отсутствия сколь либо заметной гомологии с ними. Это особенно вероятно для вирусов, присутствующих в хостах, которые ранее не подвергались скринингу на вирусные патогены, или те, которые сильно разошлись генетически. Как следствие, для лучшего понимания «виросферы» требуется со-

четание более экспансивной выборки и серьезных улучшений в алгоритмах вычислительного анализа. Парадоксально, но чем больше мы вникаем в «виросферу», тем более очевидным становится тот факт, что мы охарактеризовали лишь крайне незначительную часть вирусов, с систематическим уклоном против выявления наиболее расходящихся геномов [95, 112].

Наконец, существует и другая распространенная проблема большинства тестов на основе технологий NGS, как метагеномных так и прочих, заключающаяся в том, что сложные многоступенчатые процессы могут создавать серьезные проблемы для воспроизводимости результатов, что также мешает внедрению этих технологий в диагностическую практику, где цена ошибки особенно высока.

Получение полных геномов вирусов

Для небольших вирусов, таких как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, англ. HIV), вирус гриппа, вирус гепатита В (HBV) и вирус гепатита С (HCV), широко используется секвенирование фрагментов геномов для научных исследований, что, впрочем, имеет и важное клиническое применение. Таргетное секвенирование небольшого числа генов, кодирующих мишени противовирусных агентов, таких как ВИЧ, уже стало нормой в клинической практике. Для обнаружения ограниченного числа антивирусоустойчивых вариантов полногеномное секвенирование до недавнего времени было слишком дорогостоящей и трудоемкой процедурой для использования по сравнению с прочтением отдельных генов, на которые нацелены лекарственные препараты. Тем не менее, постепенно мы получаем новую информацию о все большем числе генов устойчивости, что вкупе с уменьшением затрат на секвенирование приводит к переосмыслению потребности в WGS при исследованиях. Рутинное использование WGS патогенов для диагностических целей [1], вероятно, в скором будущем будет иметь более широкие клинические и исследовательские преимущества. Например, последовательности вируса Зика, которые были обнаружены в эпидемиологических целях, влияют на принятия решений в общественном здравоохранении [31]. Геномы ВИЧ, секвенированные для идентификации противовирусных резистентных вариантов, также использовались для изучения эволюции вируса [68] и вирусной генетической ассоциации с заболеванием, включая исследования ассоциаций генотип–фенотип, а также связи генетических вариантов хозяина и результатов инфицирования, включая установление вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции [8, 82].

В настоящее время стоимость секвенирования полных вирусных геномов, несмотря на их небольшой размер, все же существенно выше, чем стоимость секвенирования отдельных генов устойчивости к лекарственным препаратам. Разница в затратах между секвенированием целевой области и целого генома вируса во многом определяется размером генома по сравнению с размером и количеством целевых локусов. Тем не менее, информация о целом геноме может предоставить важную дополнительную информацию, как описано выше.

Обогащение вирусного генетического материала ПЦР-амплификацией с использованием специфичных праймеров

Альтернативой метагеномным подходам является целевое обогащение определенного вирусного генома(-ов) или их фрагментов перед секвенированием. Так, эффективность исследования может быть значительно увеличена за счет комбинирования родоспецифичной ПЦР и технологий NGS. ПЦР-амплификация вирусного генетического материала с использованием праймеров, которые являются комплементарными известной нуклеотидной последовательности, является наиболее распространенным подходом для обогащения небольших вирусных геномов, таких как ВИЧ и вирус гриппа. Недавние примеры обогащения ПЦР-амплификацией, за которым следует секвенирование, включают филогенетический анализ вспышки вируса кори на зимних Олимпийских играх 2010 г. [33] и отслеживание недавних эпидемий вирусов Эболы и Зика. С помощью секвенирования амплифицированных длинных (2,5–3 т.п.о.) фрагментов была исследована вариабельность генома норовируса и возможность его нозокомиальной передачи среди пациентов нескольких госпиталей во Вьетнаме [19, 57], что выявило как независимые интродукции возбудителя в больницу, так и внутрибольничную передачу, несмотря на предпринимаемые меры по борьбе с инфекцией. Аналогичный подход был использован в работе по определению чувствительности и специфичности платформы Illumina при идентификации минорных полиморфизмов в смешанных популяциях ВИЧ [53]. В других исследованиях глубокого секвенирования на основе ПЦР были получены полные геномы вируса гриппа [108] (13,5 кб), вируса денге [79] (11 кб) и HCV [75] (9,6 кб). Это было осуществимо на практике, поскольку эти вирусы имеют сравнительно небольшие геномы, для покрытия и сборки полногеномных последовательностей которых требуется всего несколь-

ко ПЦР-ампликонов. Однако, гетерогенность РНК содержащих вирусов, таких как HCV27, норовирусов [19] и вируса бешенства [69], может потребовать использования множественных перекрывающихся сетов праймеров для обеспечения амплификации всех известных геновариантов вируса. Известно, что ПЦР-амплификация более подходит для WGS образцов с низкой концентрацией вирусов, чем метагеномные методы [99], хотя и другие методы, такие как целевое обогащение вирусных последовательностей, могут тоже приводить к хорошим результатам в такого рода образцах. Например, это было показано для норовируса [13].

Перекрывающиеся ПЦР-ампликоны в сочетании с NGS использовались для секвенирования целых геномов больших вирусов, таких как, например, HCMV [84], но этот метод имеет ограниченную масштабируемость, так как требуется синтез множества праймеров и относительно большое количество исходной ДНК. Этот факт ограничивает число подходящих образцов, а соответственно и геномов, которые могут быть получены с использованием такого подхода. Например, для амплификации генома вируса Эбола потребовалось 8–19 продуктов ПЦР [83], а в двух исследованиях норовирусов было необходимо 14 и 22 продуктов ПЦР соответственно [19, 57]. Для получения генома вируса Парамушир понадобилось 60 ПЦР продуктов, а также дополнительные эксперименты по секвенированию с применением прямого метода Сенгера для покрытия недосеквенированных участков [89]. Однако, для клинической диагностики такой подход является проблематичным из-за значительного объема лабораторной нагрузки, связанной с многочисленными ПЦР постановками, необходимости индивидуальной нормализации концентраций различных ПЦР-продуктов до смешивания, высокой вероятности отказа ПЦР-реакции из-за несоответствия праймера матрице (особенно для быстро мутирующих вирусов [89]), а также высокой стоимости расходных материалов и трудозатрат [10]. Поэтому, несмотря на техническую возможность секвенирования вирусов размером вплоть до 250 кб, пропорциональная взаимосвязь между длиной генома и технической сложностью делает секвенирование вирусных геномов более чем 50 кб на основе ПЦР нецелесообразным с использованием современных технологий, в частности для крупных исследований с большим числом образцов или рутинной диагностики. Другая проблема заключается в том, что повышение количества ПЦР-реакций требует соответствующего увеличения количества материала, что не всегда возможно, так как объем клинического образца обычно ограничен. Развитие микрофлюидных

технологий может помочь преодолеть некоторые из этих барьеров. ПЦР на основе микрофлюидики и пулирование большого числа ампликонов были успешно использованы для секвенирования нескольких локусов устойчивости к противомикробным препаратам (например, из микробиома свиней) [47], и могут также применяться для вирусных геномов, потенциально вплоть до уровня единичных геномов [76].

Высоковариабельные патогены, особенно те, которые имеют широко расходящиеся генетические линии и генотипы, такие как HCV [11], вирус гриппа и норовирусы, вызывают серьезные проблемы для ПЦР-амплификации, особенно из-за несоответствия праймеров матрице [13, 19, 99]. Тщательный подход при дизайне структур праймеров может помочь смягчить эти проблемы, но процесс изучения новых вариантов все же остается проблематичным. Стоит также отметить, что в ряде случаев различия между матрицей и праймерами настолько велики, что могут выпадать целые вирусные сегменты, как было показано для вируса Парамушир [89].

Специфическое обогащение вирусного генетического материала путем гибридизации

Целевое обогащение на зондах (также известное как гибридизация или специфическое обогащение) может быть использовано для секвенирования полных вирусных геномов непосредственно из клинических образцов без необходимости предварительного культивирования или ПЦР [24, 101, 111]. Эти методы обычно включают небольшие РНК- или ДНК-зонды, которые являются комплементарными к референсной последовательности патогенов (или панели эталонных последовательностей). В отличие от методов на основе ПЦР-амплификации, в данном случае реакцию можно проводить в одной пробирке, содержащей перекрывающиеся зонды, которые покрывают весь геном. В реакции гибридизации зонды, связанные с твердой подложкой (например, мечеными стрептавидином магнитными частицами), захватывают или «вытягивают» комплементарные последовательности ДНК из общего пула нуклеиновых кислот, присутствующих в образце. Захват сопровождается последующим лигированием адаптеров, специфичных для секвенатора, и небольшим числом циклов ПЦР для обогащения успешно лигированных фрагментов. Этот подход ранее был успешно использован для характеристики клинически значимых вирусов разного размера, таких как вирус гепатита С [99], HSV-1 [28], вирус ветряной оспы (VZV) [24], вирус Эпштейна–Барр (EBV) [78], вирус герпеса че-

ловека 5 (HCMV) [23], вирус герпеса человека 6 (HHV6) [102] и вирус герпеса человека 7 (HHV7) [26]. Реакция проводится в одной пробирке и, подобно ПЦР на основе микрофлюидики, поддается высокой степени автоматизации [78]. Отсутствие стадии культивирования означает, что полученные последовательности более характерны для исходного вируса, а не для культивируемых вирусных изолятов, соответственно получается меньшее число мутаций, чем в ПЦР-амплифицированных образцах [23, 24]. Успех этого метода очень сильно зависит от доступных эталонных (референсных) вирусных последовательностей. Специфичность увеличивается, когда дизайн ДНК-зондов произведен на основе большого набора референсных последовательностей, поскольку это приводит к лучшему охвату как внутри одного, так и между разными образцами. Целевое обогащение возможно даже когда имеется небольшое несоответствие между матрицей и зондом; однако, в то время как ПЦР-амплификация требует только знания фланкирующих областей целевой области, для целевого обогащения путем гибридизации необходима информация о всей внутренней последовательности для дизайна зондов. Впрочем, даже если какой-то зонд не «срабатывает», его область может по-прежнему захватываться другими (перекрывающимися или соседними) зондами [23, 24]. Недавно, Briese и соавт. [12] разработали платформу для секвенирования вирусов позвоночных (VirCapSeq-VERT), состоящую из ~2 млн биотинилированных ДНК-зондов для целевого обогащения вирусных нуклеиновых кислот, направленную на повышение чувствительности обнаружения вирусных патогенов. Описанный метод позволяет идентифицировать (и в ряде случаев даже осуществлять сборку целых геномов обнаруженных вирусов) большое число вирусов, включая новые (имеющие не менее 60% идентичности с известными геномами) вирусы. Впрочем, общая стоимость секвенирования на образец остается все еще достаточно высокой, а сам метод пока не был широко востребован другими исследовательскими группами, и его эффективность еще предстоит оценить. Однако стоит отметить, что целевое обогащение не подходит для характеристики совершенно новых вирусов, которые имеют низкую гомологию с известными вирусами, и для которых метагеномика, а также в некоторых случаях и ПЦР с использованием вырожденных (смесь аналогичных, но вариативных) праймеров, могут быть более подходящими подходами, хотя и приводящими к очень «шумному» результату. Впрочем, проблему анализа данных, а именно идентификации новых вирусных агентов при отсутствии гомологичных геномов в базах данных, это не решает.

ДНК-метабаркодинг как способ детекции и идентификации патогенов в биологических образцах

ДНК-баркодинг — метод, который использует короткую часть генома организма (так называемый штрих- или бар-код), чтобы определить принадлежит ли он к определенному семейству, роду или даже виду, используя последующее прочтение фрагмента генома. Этот метод был первоначально разработан для изучения бактериальных сообществ (например, исследования микробиоты кишечника), но сегодня он широко используется для решения самых различных задач, включая даже такие необычные применения как выявление фальсификации в пищевой промышленности [97], изучение диет морских сообществ [9] и анализ биотоплива [45]. Однако, в отличие от других таксонов, вирусы не имеют универсально разделенного филогенетического маркера (как, например, 16S у бактерий, оксидазы цитохрома С для птиц и млекопитающих, *rbcL* и *matK* для растений и внутреннего транскрибируемого спейсера ITS для грибов и растений), что делает невозможным разработку универсальных пар праймеров для амплификации и дифференциации различных вирусных последовательностей. Кроме того, вирусная таксономия зачастую основана на признаках вызываемых заболеваний, а не на генетическом сходстве патогенов. Этот факт усложняет выбор штрих-кода (короткой стандартизированной нуклеотидной последовательности ДНК организма), даже для одного рода (например, *Mammarenavirus* может быть серологически, филогенетически и географически разделен на две основные группы: комплекс «Старого Света», распространенный в Африке, Европе и Азии, а также комплекс «Новый мир», обнаруженный в Северной и Южной Америках [38]), не говоря уже о более высоких таксонах.

В ДНК-метабаркодинге вирусов ПЦР продукты разных постановок (на каждой отдельной паре праймеров) для каждого образца собирают в одну пробирку, очищают, элюируют в минимальном объеме и готовят для последующего NGS секвенирования [20]. Однако этот подход не исключает требования выполнения множества ПЦР реакций на каждый образец, что является проблемой при одновременном изучении большого количества биологического материала. Кроме того, существуют ограничения на использование разных протоколов для подготовки библиотеки, особенно когда протокол включает стадию эмульсионной ПЦР, требующей ПЦР-продуктов с длинами в довольно узких границах. Потому в нашем недавнем исследовании [7] мы внедрили способ дизайна

олигонуклеотидных панелей для целевого обогащения вирусных нуклеиновых кислот, где основной целью являлось использование минимального набора олигонуклеотидов праймеров для покрытия максимального числа различных вирусных таксонов в рамках единой реакции ПЦР. Мы применили этот подход для разработки панели родоспецифических праймеров для целевого обогащения кДНК от зоонозных РНК-вирусов и оценили ее с использованием технологий NGS на образцах перелетных птиц, продемонстрировав значительное обогащение вирусными последовательностями отдельных родов. Так, например, мы сумели добиться того, что до половины всех полученных прочтений в конечном «fastq»-файле соответствовали регионам вирусных геномов, в то время как при секвенировании транскриптомных библиотек, полученных от тех же самых образцов, в ряде случаев мы вообще не смогли обнаружить вирусных фрагментов, либо их доля была крайне мала (тысячные доли процента).

Технологии секвенирования третьего поколения

Современные технологии NGS второго поколения, такие как Illumina или Ion Torrent, генерируют данные с короткими прочтениями (обычно 200–500 п.н.), что среди прочего создает проблемы при гаплотипировании, то есть определении находятся ли генетические варианты на едином локусе (один вирусный геном или клонал) или на родственных, очень сходных, но все же разных генетических локусах в одной и той же популяции. Более того, с использованием коротких прочтений сложнее различать повторяющиеся и рекомбинантные регионы из-за неоднозначностей при картировании. Клинические последствия понимания того, встречаются ли, например, варианты с множественной лекарственной устойчивостью на одном вирусном геноме или распределяются между смешанной популяцией вирусов, каждая с разными профилями лекарственной устойчивости, в настоящее время неясны.

Хотя для решения этих проблем есть вычислительные инструменты [40], новые технологии могут генерировать более длинные прочтения. Новые, одномолекулярные секвенаторы, такие как PacBio (Pacific Biosciences) и MinION (Oxford Nanopore) — так называемые «секвенаторы третьего поколения», способны производить чрезвычайно длинные прочтения, включая целые вирусные геномы, которые теоретически можно было бы получить из единичных прочтений. Преимущество секвенирования на приборе MinION, помимо его невысокой стоимости

(относительно приборов от компаний Illumina и Thermo Fisher Scientific) и, в то же время, высокой мобильности, заключается в том, что это достаточно быстрый процесс — зачастую требуется менее одного дня, чтобы перейти от полученного образца к отчету по анализируемым данным [92]. Наши собственные эксперименты с прибором MinION показали, что, действительно, применяя эту технологию можно прочитывать полные геномы ВИЧ с точностью, которая, как минимум, не отличается от точности современных полупроводниковых секвенаторов Ion S5 [96].

Недостатком всех NGS методов, в том числе одномолекулярного секвенирования, является потребность в высоком покрытии для минимизации влияния ошибок секвенирования. Это особенно проблематично для исследований резистентности к лекарственным средствам, поскольку резистентность к лекарствам чаще всего проявляется в результате однонуклеотидных мутаций или небольших делеций (1–3 оснований), особенно в некоторых РНК-вирусах [52]. Достижение высокого покрытия, необходимого для обеспечения точного варианта типирования, является сложной технической задачей, особенно когда присутствует много ДНК хозяина по сравнению с вирусными последовательностями, и когда профиль ошибок технологии делает точечные мутации особенно трудными для обнаружения [92]. На момент написания этого обзора секвенирование на MinION имеет «сырое» качество (так называемые «2D-чтения») с частотой ошибок одного случайного чтения примерно 10% (наши собственные наблюдения), что заметно уступает частотам ошибок других технологий (Illumina (< 0,1%), Ion Torrent (~1%), хотя точность и может быть улучшена с использованием циклического консенсусного считывания [62, 100]. Стоит также отметить, что увеличение покрытия с последующим усреднением для устранения случайных ошибок секвенирования также приводит к невозможности обнаружения так называемых минорных вариантов, присутствующих лишь в очень ограниченной доле патогенов, находящихся в образце.

Впрочем, объединение технологий длинных прочтений с целевым обогащением дает потенциальный путь к дальнейшему развитию [29, 49], поскольку часть сложностей может быть разрешена, особенно если для целевого патогена достигнута достаточная глубина секвенирования, а частота ошибок для всех методологий может быть уменьшена за счет дальнейшего технологического и аналитического улучшения. Деплеция нуклеиновых кислот хозяина является другим альтернативным (и зачастую дополнительным) решением, так как более вы-

сокая доля вирусных прочтений будет восстанавливаться при каждом цикле секвенирования. Несмотря на то что для достижения этой цели для бактериального секвенирования уже имеются решения (например, деплеция рибосомальной РНК человека или митохондрий, а также селективная деплеция ДНК с определенной моделью метилирования), для секвенирования вирусов до сих пор подобных методов просто не существует.

Проблемы, которые предстоит решить в ближайшем будущем

Вопросы чувствительности и контаминации особенно актуальны в секвенировании вирусов из-за риска как ложноотрицательного, так и ложноположительного обнаружения патогенов. Высокочувствительное секвенирование (будь то метагеномное, основанное на ПЦР, или целевом обогащении с помощью зондов) помогает обнаруживать даже небольшие количества загрязняющих вирусных нуклеиновых кислот [42, 73]. Например, вирус мышинной лейкемии [30, 43] и парвовирус-подобные последовательности [74, 87] представляют собой всего лишь два классических примера среди многих контаминационных агентов, которые могут быть получены даже из обычных лабораторных реагентов, таких как колонки для выделения нуклеиновых кислот [90]. Как и в случае с другими высокочувствительными технологиями, для минимизации загрязнения необходимы надежные лабораторные методы и протоколы, во многом схожие, например, с применяемыми при работах с древней ДНК [67], хотя обычно и не настолько жесткие. Также важно помнить, что обнаружение вирусных нуклеиновых кислот не обязательно определяет причину заболевания, и при использовании методов NGS для диагностики вирусных инфекций важно подтверждать результаты с помощью альтернативных независимых методов, которые не зависят от тестирования на присутствие фрагментов ДНК. Например, в случаях энцефалита неизвестного происхождения положительные результаты NGS могут быть подтверждены иммуногистохимическим анализом пораженной ткани [64, 71] или идентификацией вируса с помощью электронной микроскопии или тканевой культуры [39].

Стандартизация методов, включая этап биоинформатического анализа, скорее всего, будет являться основным ключом к успеху NGS секвенирования в клинической вирусологии. Программные пакеты, которые будут использовать графический интерфейс пользователя, предпочтительнее инструментов, требующих экспертных знаний в командной строке Linux.

Кроме того, разработка и создание достоверных баз данных, показывающих какие варианты действительно свидетельствуют о резистентности к лекарственным средствам, будет иметь решающее значение для точной клинической интерпретации. Такие базы данных уже созданы для ВИЧ [93], HBV [35, 86] и HCV [56].

Несмотря на то что существуют серьезные причины для перехода от субгеномного к полногеномному секвенированию и в целом для использования NGS в клинической вирусологии, специалистов диагностических или прибольничных лабораторий необходимо убедить в важности такого перехода, продемонстрировав преимущества наличия дополнительной информации для ведения больных и практической осуществимости полногеномного секвенирования вирусов. Последнее должно обеспечиваться масштабируемым и автоматизируемым рабочим процессом, адекватной нормативной базой и стоимостью, сопоставимой с секвенированием фрагментов.

Заключение

Секвенирование вирусов с помощью технологий NGS приобретает все большее клиническое значение для диагностики, борьбы с болезнями, молекулярной эпидемиологии и инфекционного контроля. Как уже перечис-

лено выше, существует несколько подходов, доступных для достижения прочтения генетического материала вирусов из клинических образцов, ампликонов, целевого обогащения или метагеномики, и выбор метода специфичен как для вируса, так и для задачи. Метагеномное секвенирование наиболее подходит для диагностического секвенирования неизвестных или плохо охарактеризованных вирусов, секвенирование ПЦР-ампликонов хорошо работает для коротких вирусных геномов и низкого генетического разнообразия в сайтах связывания праймеров, а целевое обогащение подходит для патогенов всех размеров, в особенности для крупных вирусов, а также тех, которые имеют разнообразные, но хорошо охарактеризованные геномы. В настоящее время существуют две очевидные области инноваций: методы, которые могут эффективно устранять ДНК хозяина и бактериальных микроорганизмов, не влияя на вирусную ДНК/РНК, и дальнейшее развитие технологий длинных прочтений для достижения гибкого и конкурентного ценообразования по сравнению с технологиями коротких прочтений. Новые технологии необходимы для объединения сильных сторон этих разных методов, и позволят поставщикам медицинских услуг инвестировать в единую технологию, подходящую для всех вирусологических приложений.

Список литературы/References

1. Aanensen D.M., Feil E.J., Holden M.T.G., Dordel J., Yeats C.A., Fedosejev A., Goater R., Castillo-Ramírez S., Corander J., Colijn C., Chlebowicz M.A., Schouls L., Heck M., Pluister G., Ruimy R., Kahlmeter G., Åhman J., Matuschek E., Friedrich A.W., Parkhill J., Bentley S.D., Spratt B.G., Grundmann H. Whole-genome sequencing for routine pathogen surveillance in public health: a population snapshot of invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 3. doi: 10.1128/mBio.00444-16
2. Allen U.D., Hu P., Pereira S.L., Robinson J.L., Paton T.A., Beyene J., Khodai-Booran N., Dipchand A., Hébert D., Ng V., Nalpathamkalam T., Read S. The genetic diversity of Epstein–Barr virus in the setting of transplantation relative to non-transplant settings: a feasibility study. *Pediatr. Transplant.*, 2016, vol. 20, no. 1, pp. 124–129. doi: 10.1111/ptr.12610
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
4. Ambrose H.E., Clewley J.P. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev. Med. Virol.*, 2006, vol. 16, no. 6, pp. 365–383. doi: 10.1002/rmv.515
5. Anthony S.J., Epstein J.H., Murray K.A., Navarrete-Macias I., Zambrana-Torrel C.M., Solovyov A., Ojeda-Flores R., Arrigo N.C., Islam A., Ali Khan S., Hosseini P., Bogich T.L., Olival K.J., Sanchez-Leon M.D., Karesh W.B., Goldstein T., Luby S.P., Morse S.S., Mazet J.A.K., Daszak P., Lipkin W.I. A Strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio*, 2013, vol. 4, no. 5. doi: 10.1128/mBio.00598-13
6. Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K., Baratin D., Csardi G., de Castro E., Duvaud S., Flegel V., Fortier A., Gasteiger E., Grosdidier A., Hernandez C., Ioannidis V., Kuznetsov D., Liechti R., Moretti S., Mostaguir K., Redaschi N., Rossier G., Xenarios I., Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucl. Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. W1, pp. W597–W603. doi: 10.1093/nar/gks400
7. Ayginin A.A., Pimkina E.V., Matsvay A.D., Speranskaya A.S., Safonova M.V., Blinova E.A., Artyushin I.V., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Khafizov K. The Study of viral RNA diversity in bird samples using de novo designed multiplex genus-specific primer panels. *Adv. Virol.*, 2018, vol. 2018, pp. 1–10. doi: 10.1155/2018/3248285
8. Bartha I., Carlson J.M., Brumme C.J., McLaren P.J., Brumme Z.L., John M., Haas D.W., Martinez-Picado J., Dalmau J., López-Galíndez C., Casado C., Rauch A., Günthard H.F., Bernasconi E., Vernazza P., Klimkait T., Yerly S., O'Brien S.J., Listgarten J., Pfeifer N., Lippert C., Fusi N., Kotalik Z., Allen T.M., Müller V., Harrigan P.R., Heckerman D., Telenti A., Fellay J., for the HIV Genome-to-Genome Study and the Swiss HIV Cohort Study. A genome-to-genome analysis of associations between human genetic variation, HIV-1 sequence diversity, and viral control. *eLife*, 2013, vol. 2. doi: 10.7554/eLife.01123
9. Berry T.E., Osterrieder S.K., Murray D.C., Coghlan M.L., Richardson A.J., Grealy A.K., Stat M., Bejder L., Bunce M. DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: a case study using the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Ecol. Evol.*, 2017, vol. 7, no. 14, pp. 5435–5453. doi: 10.1002/ece3.3123

10. Bialasiewicz S., McVernon J., Nolan T., Lambert S.B., Zhao G., Wang D., Nissen M.D., Sloots T.P. Detection of a divergent Parainfluenza 4 virus in an adult patient with influenza like illness using next-generation sequencing. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14, no. 1. doi: 10.1186/1471-2334-14-275
11. Bonsall D., Ansari M.A., Ip C., Trebes A., Brown A., Klenerman P., Buck D., STOP-HCV Consortium, Piazza P., Barnes E., Bowden R. ve-SEQ: robust, unbiased enrichment for streamlined detection and whole-genome sequencing of HCV and other highly diverse pathogens. *F1000Research*, 2015, vol. 4, p. 1062. doi: 10.12688/f1000research.7111.1
12. Briese T., Kapoor A., Mishra N., Jain K., Kumar A., Jabado O.J., Lipkin W.I. Virome capture sequencing enables sensitive viral diagnosis and comprehensive virome analysis. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 5. doi: 10.1128/mBio.01491-15
13. Brown J.R., Roy S., Ruis C., Yara Romero E., Shah D., Williams R., Breuer J. Norovirus whole-genome sequencing by sureselect target enrichment: a robust and sensitive method. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, vol. 54, no. 10, pp. 2530–2537. doi: 10.1128/JCM.01052-16
14. Calvet G., Aguiar R.S., Melo A.S.O., Sampaio S.A., de Filippis I., Fabri A., Araujo E.S.M., de Sequeira P.C., de Mendonça M.C.L., de Oliveira L., Tschoeke D.A., Schrago C.G., Thompson F.L., Brasil P., dos Santos F.B., Nogueira R.M.R., Tanuri A., de Filippis A.M.B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, no. 6, pp. 653–660. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
15. Castrignano S.B., Nagasse-Sugahara T.K., Kisielius J.J., Ueda-Ito M., Brandão P.E., Curti S.P. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and electron microscopy analysis. *Virus Res.*, 2013, vol. 178, no. 2, pp. 364–373. doi: 10.1016/j.virusres.2013.09.018
16. Chen Y., Yao H., Thompson E.J., Tannir N.M., Weinstein J.N., Su X. VirusSeq: software to identify viruses and their integration sites using next-generation sequencing of human cancer tissue. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no. 2, pp. 266–267. doi: 10.1093/bioinformatics/bts665
17. Choi S.K., Choi J.K., Park W.M., Ryu K.H. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol. Methods*, 1999, vol. 83, no. 1–2, pp. 67–73. doi: 10.1016/S0166-0934(99)00106-8
18. Clarke S., Innocenti G.M. Organization of immature intrahemispheric connections. *J. Comp. Neurol.*, 1986, vol. 251, no. 1, pp. 1–22. doi: 10.1002/cne.902510102
19. Cotten M., Petrova V., Phan M.V.T., Rabaa M.A., Watson S.J., Ong S.H., Kellam P., Baker S. Deep sequencing of Norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 19, pp. 11056–11069. doi: 10.1128/JVI.01333-14
20. De Vries M., Deijs M., Canuti M., van Schaik B.D.C., Faria N.R., van de Garde M.D.B., Jachimowski L.C.M., Jebbink M.F., Jakobs M., Luyf A.C.M., Coenjaerts F.E.J., Claas E.C.J., Molenkamp R., Koekkoek S.M., Lammens C., Leus F., Goossens H., Ieven M., Baas F., van der Hoek L. A sensitive assay for virus discovery in respiratory clinical samples. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 1: e16118. doi: 10.1371/journal.pone.0016118
21. Dedkov V.G., Lukashev A.N., Deviatkin A.A., Kuleshov K.V., Safonova M.V., Poleshchuk E.M., Drexler J.F., Shipulin G.A. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing. *J. Clin. Virol.*, 2016, vol. 78, pp. 74–81. doi: 10.1016/j.jcv.2016.03.012
22. Denesvre C., Dumarest M., Rémy S., Gourichon D., Eloit M. Chicken skin virome analyzed by high-throughput sequencing shows a composition highly different from human skin. *Virus Genes*, 2015, vol. 51, no. 2, pp. 209–216. doi: 10.1007/s11262-015-1231-8
23. DePew J., Zhou B., McCarrison J.M., Wentworth D.E., Purushe J., Koroleva G., Fouts D.E. Sequencing viral genomes from a single isolated plaque. *Virol. J.*, 2013, vol. 10, no. 1: 181. doi: 10.1186/1743-422X-10-181
24. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., Gershon A., Kinchington P.R., Schmid D.S., Balloux F., Nichols R.A., Breuer J. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of Varicella Zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.*, 2014, vol. 31, no. 2, pp. 397–409. doi: 10.1093/molbev/mst210
25. Depledge D.P., Palser A.L., Watson S.J., Lai I.Y.-C., Gray E.R., Grant P., Kanda R.K., Leproust E., Kellam P., Breuer J. Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 11: e27805. doi: 10.1371/journal.pone.0027805
26. Djikeng A., Halpin R., Kuzmickas R., DePasse J., Feldblyum J., Sengamalay N., Afonso C., Zhang X., Anderson N.G., Ghedin E., Spiro D.J. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics*, 2008, vol. 9, no. 1: 5. doi: 10.1186/1471-2164-9-5
27. Donaldson C.D., Clark D.A., Kidd I.M., Breuer J., Depledge D.D. Genome sequence of Human Herpesvirus 7 strain UCL-1. *Genome Announc.*, 2013, vol. 1, no. 5. doi: 10.1128/genomeA.00830-13
28. Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.-R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A.M., Berger A., Burguière A.-M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.-C., Müller S., Rickerts V., Stürmer M., Vieth S., Klenk H.-D., Osterhaus A.D.M.E., Schmitz H., Doerr H.W. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 348, no. 20, pp. 1967–1976. doi: 10.1056/NEJMoa030747
29. Ebert K., Depledge D.P., Breuer J., Harman L., Elliott G. Mode of virus rescue determines the acquisition of VHS mutations in VP22-negative Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 18, pp. 10389–10393. doi: 10.1128/JVI.01654-13
30. Eckert S.E., Chan J.Z.-M., Houniet D., Breuer J., Speight G. Enrichment of long DNA fragments from mixed samples for Nanopore sequencing. *bioRxiv: The preprint server for biology*, 2016. doi: 10.1101/048850
31. Erlwein O., Robinson M.J., Dustan S., Weber J., Kaye S., McClure M.O. DNA extraction columns contaminated with murine sequences. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 8: e23484. doi: 10.1371/journal.pone.0023484
32. Faria N.R., Azevedo R.D.S.D.S., Kraemer M.U.G., Souza R., Cunha M.S., Hill S.C., Theze J., Bonsall M.B., Bowden T.A., Rissanen I., Rocco I.M., Nogueira J.S., Maeda A.Y., Vasami F.G.D.S., Macedo F.L.D.L., Suzuki A., Rodrigues S.G., Cruz A.C.R., Nunes B.T., Medeiros D.B.D.A., Rodrigues D.S.G., Nunes Queiroz A.L., Silva E.V.P.D., Henriques D.F., Travassos da Rosa E.S., de Oliveira C.S., Martins L.C., Vasconcelos H.B., Casseb L.M.N., Simith D.D.B., Messina J.P., Abade L., Lourenco J., Alcantara L.C.J., Lima M.M.D., Giovanetti M., Hay S.I., de Oliveira R.S., Lemos P.D.S., Oliveira L.F.D., de Lima C.P.S., da Silva S.P., Vasconcelos J.M.D., Franco L., Cardoso J.F., Vianez-Junior J.L.D.S.G., Mir D., Bello G., Delatorre E., Khan K., Creatore M., Coelho G.E., de Oliveira W.K., Tesh R., Pybus O.G., Nunes M.R.T., Vasconcelos P.F.C. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, 2016, vol. 352, no. 6283, pp. 345–349. doi: 10.1126/science.aaf5036

33. Fonseca N.A., Rung J., Brazma A., Marioni J.C. Tools for mapping high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 24, pp. 3169–3177. doi: 10.1093/bioinformatics/bts605
34. Gardy J.L., Naus M., Amlani A., Chung W., Kim H., Tan M., Severini A., Krajden M., Puddicombe D., Sahni V., Hayden A.S., Gustafson R., Henry B., Tang P. Whole-genome sequencing of measles virus genotypes H1 and D8 during outbreaks of infection following the 2010 Olympic Winter Games reveals viral transmission routes. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 10, pp. 1574–1578. doi: 10.1093/infdis/jiv271
35. Geoghegan J.L., Holmes E.C. Predicting virus emergence amid evolutionary noise. *Open Biol.*, 2017, vol. 7, no. 10. doi: 10.1098/rsob.170189
36. Gnanesan S., Ijaz S., Moran J., Ramsay M., Green J. HepSEQ: international public health repository for hepatitis B. *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 35, pp. D367–D370. doi: 10.1093/nar/gkl874
37. Goodacre N., Aljanahi A., Nandakumar S., Mikailov M., Khan A.S. A Reference Viral Database (RVDB) to enhance bioinformatics analysis of high-throughput sequencing for novel virus detection. *mSphere*, 2018, vol. 3, no. 2. doi: 10.1128/mSphereDirect.00069-18
38. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.*, 2011, vol. 29, no. 7, pp. 644–652. doi: 10.1038/nbt.1883
39. Günther S., Lenz O. Lassa virus. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2004, vol. 41, no. 4, pp. 339–390. doi: 10.1080/10408360490497456
40. Hall R.J., Draper J.L., Nielsen F.G.G., Dutilh B.E. Beyond research: a primer for considerations on using viral metagenomics in the field and clinic. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00224
41. Hong L.Z., Hong S., Wong H., Aw P., Yan C., Wilm A., de Sessions P.F., Lim S., Nagarajan N., Hibberd M.L., Quake S.R., Burkholder W.F. BAsE-Seq: a method for obtaining long viral haplotypes from short sequence reads. *Genome Biol.*, 2014, vol. 15, no. 11: 517. doi: 10.1186/PREACCEPT-6768001251451949
42. Houldcroft C.J., Beale M.A., Breuer J. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 3, pp. 183–192. doi: 10.1038/nrmicro.2016.182
43. Houldcroft C.J., Breuer J. Tales from the crypt and coral reef: the successes and challenges of identifying new herpesviruses using metagenomics. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00188
44. Hue S., Gray E.R., Gall A., Katzourakis A., Tan C.P., Houldcroft C.J., McLaren S., Pillay D., Futreal A., Garson J.A., Pybus O.G., Kellam P., Towers G.J. Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology*, 2010, vol. 7, no. 1: 111. doi: 10.1186/1742-4690-7-111
45. Hulo C., de Castro E., Masson P., Bougueleret L., Bairoch A., Xenarios I., Le Mercier P. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, suppl. 1, pp. D576–D582. doi: 10.1093/nar/gkq901
46. Jaenicke S., Ander C., Bekel T., Bisdorf R., Dröge M., Gartemann K.-H., Jünemann S., Kaiser O., Krause L., Tille F., Zakrzewski M., Pühler A., Schlüter A., Goesmann A. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 1: e14519. doi: 10.1371/journal.pone.0014519
47. Jensen R.H., Møllerup S., Mourier T., Hansen T.A., Fridholm H., Nielsen L.P., Willerslev E., Hansen A.J., Vinner L. Target-dependent enrichment of virions determines the reduction of high-throughput sequencing in virus discovery. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 4: e0122636. doi: 10.1371/journal.pone.0122636
48. Johnson T.A., Stedtfeld R.D., Wang Q., Cole J.R., Hashsham S.A., Looft T., Zhu Y.-G., Tiedje J.M. Clusters of antibiotic resistance genes enriched together stay together in swine agriculture. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 2. doi: 10.1128/mBio.02214-15
49. Jones B.A., Grace D., Kock R., Alonso S., Rushton J., Said M.Y., McKeever D., Mutua F., Young J., McDermott J., Pfeiffer D.U. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, vol. 110, no. 21, pp. 8399–8404. doi: 10.1073/pnas.1208059110
50. Karamitros T., Magiorkinis G. A novel method for the multiplexed target enrichment of MinION next generation sequencing libraries using PCR-generated baits. *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, no. 22, pp. e152–e152. doi: 10.1093/nar/gkv773
51. Karkhah A., Nouri H.R., Javanian M., Koppolu V., Masrouh-Roudsari J., Kazemi S., Ebrahimpour S. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2018, vol. 37, no. 11, pp. 2035–2043. doi: 10.1007/s10096-018-3354-z
52. Kent W.J. BLAT — the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.*, 2002, vol. 12, no. 4, pp. 656–664. doi: 10.1101/gr.229202
53. Kimberlin D.W., Whitley R.J. Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1996, vol. 37, no. 3, pp. 403–421.
54. Kireev D.E., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Neverov A.D., Fedonin G.G., Fantin Y.S., Shipulin G.A. Evaluating the accuracy and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing. *J. Virol. Methods*, 2018, vol. 261, pp. 40–45. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.001
55. Kohl C., Brinkmann A., Dabrowski P.W., Radonić A., Nitsche A., Kurth A. Protocol for metagenomic virus detection in clinical specimens. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, vol. 21, no. 1, pp. 48–57. doi: 10.3201/eid2101.140766
56. Kruppa J., Jo W.K., van der Vries E., Ludlow M., Osterhaus A., Baumgaertner W., Jung K. Virus detection in high-throughput sequencing data without a reference genome of the host. *Infect. Genet. Evol.*, 2018, vol. 66, pp. 180–187. doi: 10.1016/j.meegid.2018.09.026
57. Kuiken C., Yusim K., Boykin L., Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, no. 3, pp. 379–384. doi: 10.1093/bioinformatics/bth485
58. Kundu S., Lockwood J., Depledge D.P., Chaudhry Y., Aston A., Rao K., Hartley J.C., Goodfellow I., Breuer J. Next-generation whole genome sequencing identifies the direction of norovirus transmission in linked patients. *Clin. Infect. Dis.*, 2013, vol. 57, no. 3, pp. 407–414. doi: 10.1093/cid/cit287
59. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, no. 4, pp. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
60. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, 2009, vol. 10, no. 3: R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25

61. Lecuit M., Eloit M. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, vol. 4. doi: 10.3389/fcimb.2014.00025
62. Lee W.-P., Stromberg M.P., Ward A., Stewart C., Garrison E.P., Marth G.T. MOSAIK: a hash-based algorithm for accurate next-generation sequencing short-read mapping. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e90581. doi: 10.1371/journal.pone.0090581
63. Li C.-X., Shi M., Tian J.-H., Lin X.-D., Kang Y.-J., Chen L.-J., Qin X.-C., Xu J., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife*, 2015, vol. 4. doi: 10.7554/eLife.05378
64. Li C., Chng K.R., Boey E.J.H., Ng A.H.Q., Wilm A., Nagarajan N. INC-Seq: accurate single molecule reads using nanopore sequencing. *GigaScience*, 2016, vol. 5, no. 1. doi: 10.1186/s13742-016-0140-7
65. Lipkin W.I. A Vision for investigating the microbiology of health and disease. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, suppl. 1, pp. S26–S30. doi: 10.1093/infdis/jiu649
66. Liu P., Fang X., Feng Z., Guo Y.-M., Peng R.-J., Liu T., Huang Z., Feng Y., Sun X., Xiong Z., Guo X., Pang S.-S., Wang B., Lv X., Feng F.-T., Li D.-J., Chen L.-Z., Feng Q.-S., Huang W.-L., Zeng M.-S., Bei J.-X., Zhang Y., Zeng Y.-X. Direct sequencing and characterization of a clinical isolate of Epstein–Barr virus from nasopharyngeal carcinoma tissue by using next-generation sequencing technology. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 21, pp. 11291–11299. doi: 10.1128/JVI.00823-11
67. Matranga C.B., Andersen K.G., Winnicki S., Busby M., Gladden A.D., Tewhey R., Stremmlau M., Berlin A., Gire S.K., England E., Moses L.M., Mikkelsen T.S., Odiya I., Ehiane P.E., Folarin O., Goba A., Kahn S.H., Grant D.S., Honko A., Hensley L., Happi C., Garry R.F., Malboeuf C.M., Birren B.W., Gnirke A., Levin J.Z., Sabeti P.C. Enhanced methods for unbiased deep sequencing of Lassa and Ebola RNA viruses from clinical and biological samples. *Genome Biol.*, 2014, vol. 15, no. 11. doi: 10.1186/s13059-014-0519-7
68. Matsvay A.D., Alborova I.E., Pimkina E.V., Markelov M.L., Khafizov K., Mustafin K.K. Experimental approaches for ancient DNA extraction and sample preparation for next generation sequencing in ultra-clean conditions. *Conserv. Genet. Resour.*, 2018. doi: 10.1007/s12686-018-1016-1
69. Mbisa J.L., Fearnhill E., Dunn D.T., Pillay D., Asboe D., Cane P.A. Evidence of self-sustaining drug resistant HIV-1 lineages among untreated patients in the United Kingdom. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, vol. 61, no. 5, pp. 829–836. doi: 10.1093/cid/civ393
70. Miia J.-V., Tiina N., Tarja S., Olli V., Liisa S., Anita H. Evolutionary trends of European bat lyssavirus type 2 including genetic characterization of Finnish strains of human and bat origin 24 years apart. *Arch. Virol.*, 2015, vol. 160, no. 6, pp. 1489–1498. doi: 10.1007/s00705-015-2424-0
71. Mlakar J., Korva M., Tul N., Popović M., Poljšak-Prijatelj M., Mraz J., Kolenc M., Resman Rus K., Vesnaver Vipotnik T., Fabjan Vodusek V., Vizjak A., Pizem J., Petrovec M., Avšič Županc T. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.*, 2016, vol. 374, no. 10, pp. 951–958. doi: 10.1056/NEJMoa1600651
72. Morfopoulou S., Brown J.R., Davies E.G., Anderson G., Virasami A., Qasim W., Chong W.K., Hubank M., Plagnol V., Desforges M., Jacques T.S., Talbot P.J., Breuer J. Human Coronavirus OC43 associated with fatal encephalitis. *N. Engl. J. Med.*, 2016, vol. 375, no. 5, pp. 497–498. doi: 10.1056/NEJMc1509458
73. Mulcahy-O’Grady H., Workentine M.L. The challenge and potential of metagenomics in the clinic. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00029
74. Munro A.C., Houldcroft C. Human cancers and mammalian retroviruses: should we worry about bovine leukemia virus? *Future Virol.*, 2016, vol. 11, no. 3, pp. 163–166. doi: 10.2217/fvl.16.5
75. Naccache S.N., Greninger A.L., Lee D., Coffey L.L., Phan T., Rein-Weston A., Aronsohn A., Hackett J., Delwart E.L., Chiu C.Y. The perils of pathogen discovery: origin of a novel parvovirus-like hybrid genome traced to nucleic acid extraction spin columns. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 22, pp. 11966–11977. doi: 10.1128/JVI.02323-13
76. Newman R.M., Kuntzen T., Weiner B., Berical A., Charlebois P., Kuiken C., Murphy D.G., Simmonds P., Bennett P., Lennon N.J., Birren B.W., Zody M.C., Allen T.M., Henn M.R. Whole genome pyrosequencing of rare hepatitis C virus genotypes enhances subtype classification and identification of naturally occurring drug resistance variants. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 208, no. 1, pp. 17–31. doi: 10.1093/infdis/jis679
77. Ocwieja K.E., Sherrill-Mix S., Mukherjee R., Custers-Allen R., David P., Brown M., Wang S., Link D.R., Olson J., Travers K., Schadt E., Bushman F.D. Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule enrichment and long-read sequencing. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. 20, pp. 10345–10355. doi: 10.1093/nar/gks753
78. Oude Munnink B.B., Jazaeri Farsani S.M., Deijns M., Jonkers J., Verhoeven J.T.P., Ieven M., Goossens H., de Jong M.D., Berkhout B., Loens K., Kellam P., Bakker M., Canuti M., Cotten M., van der Hoek L. Autologous antibody capture to enrich immunogenic viruses for viral discovery. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 11: e78454. doi: 10.1371/journal.pone.0078454
79. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Baabdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein–Barr Virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5222–5237. doi: 10.1128/JVI.03614-14
80. Parameswaran P., Charlebois P., Tellez Y., Nunez A., Ryan E.M., Malboeuf C.M., Levin J.Z., Lennon N.J., Balmaseda A., Harris E., Henn M.R. Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 16, pp. 8546–8558. doi: 10.1128/JVI.00736-12
81. Pfeiffer M., Proebster B., Kinney R.M., Kaaden O.R. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, vol. 57, no. 6, pp. 709–718.
82. Pickett B.E., Sadat E.L., Zhang Y., Noronha J.M., Squires R.B., Hunt V., Liu M., Kumar S., Zaremba S., Gu Z., Zhou L., Larson C.N., Dietrich J., Klem E.B., Scheuermann R.H. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. D1, pp. D593–D598. doi: 10.1093/nar/gkr859
83. Power R.A., Davaniah S., Derache A., Wilkinson E., Tanser F., Gupta R.K., Pillay D., de Oliveira T. Genome-Wide Association Study of HIV Whole Genome Sequences Validated using Drug Resistance. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 9: e0163746. doi: 10.1371/journal.pone.0163746
84. Quick J., Loman N.J., Duraffour S., Simpson J.T., Severi E., Cowley L., Bore J.A., Koundouno R., Dudas G., Mikhail A., Ouédraogo N., Afrough B., Bah A., Baum J.H.J., Becker-Ziaja B., Boettcher J.P., Cabeza-Cabrerizo M., Camino-Sánchez Á., Carter L.L., Doerrbecker J., Enkirch T., Dorival I.G., Hetzelt N., Hinzmann J., Holm T., Kafetzopoulou L.E., Koropogui M., Kosgey A., Kuisma E., Logue C.H., Mazzarelli A., Meisel S., Mertens M., Michel J., Ngabo D., Nitzsche K., Pallasch E.,

- Patrono L.V., Portmann J., Repits J.G., Rickett N.Y., Sachse A., Singethan K., Vitoriano I., Yemanaberhan R.L., Zekeng E.G., Racine T., Bello A., Sall A.A., Faye O., Faye O., Magassouba N., Williams C.V., Amburgey V., Winona L., Davis E., Gerlach J., Washington F., Monteil V., Jourdain M., Bererd M., Camara A., Somlare H., Camara A., Gerard M., Bado G., Baillet B., Delaune D., Nebie K.Y., Diarra A., Savane Y., Pallawo R.B., Gutierrez G.J., Milhano N., Roger I., Williams C.J., Yattara F., Lewandowski K., Taylor J., Rachwal P., J. Turner D., Pollakis G., Hiscox J.A., Matthews D.A., Shea M.K.O., Johnston A.M., Wilson D., Hutley E., Smit E., Di Caro A., Wölfel R., Stoecker K., Fleischmann E., Gabriel M., Weller S.A., Koivogui L., Diallo B., Keita S., Rambaut A., Formenty P., Günther S., Carroll M.W. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 2016, vol. 530, no. 7589, pp. 228–232. doi: 10.1038/nature16996
85. Renzette N., Bhattacharjee B., Jensen J.D., Gibson L., Kowalik T.F. Extensive genome-wide variability of Human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 5: e1001344. doi: 10.1371/journal.ppat.1001344
86. Reyes G.R., Kim J.P. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol. Cell. Probes*, 1991, vol. 5, no. 6, pp. 473–481. doi: 10.1016/S0890-8508(05)80020-9
87. Rhee S.-Y., Margeridon-Thermet S., Nguyen M.H., Liu T.F., Kagan R.M., Beggel B., Verheyen J., Kaiser R., Shafer R.W. Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery. *Antiviral Res.*, 2010, vol. 88, no. 3, pp. 269–275. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.09.012
88. Rosseel T., Pardon B., De Clercq K., Ozhelvaci O., Van Borm S. False-positive results in metagenomic virus discovery: a strong case for follow-up diagnosis. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2014, vol. 61, no. 4, pp. 293–299. doi: 10.1111/tbed.12251
89. Sabina J., Leamon J.H. Bias in whole genome amplification: causes and considerations. In: Whole genome amplification; ed. Kroneis T. *New York, NY: Springer New York*, 2015, vol. 1347, pp. 15–41. doi: 10.1007/978-1-4939-2990-0_2
90. Safonova M.V., Shchelkanov M.Y., Khafizov K., Matsvay A.D., Ayginin A.A., Dolgova A.S., Shchelkanov E.M., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Galkina I.V., Dedkov V.G. Sequencing and genetic characterization of two strains Paramushir virus obtained from the Tyuleniy Island in the Okhotsk Sea (2015). *Ticks Tick-Borne Dis.*, 2018. doi: 10.1016/j.tbd.2018.11.004
91. Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., Calus S.T., Cookson W.O., Moffatt M.F., Turner P., Parkhill J., Loman N.J., Walker A.W. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.*, 2014, vol. 12, no. 1. doi: 10.1186/s12915-014-0087-z
92. Sauvage V., Eloit M. Viral metagenomics and blood safety. *Transfus. Clin. Biol.*, 2016, vol. 23, no. 1, pp. 28–38. doi: 10.1016/j.traci.2015.12.002
93. Schmidt K., Mwaigwisya S., Crossman L.C., Doumith M., Munroe D., Pires C., Khan A.M., Woodford N., Saunders N.J., Wain J., O'Grady J., Livermore D.M. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 104–114. doi: 10.1093/jac/dkw397
94. Shafer R.W. Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 194, suppl. 1, pp. S51–S58. doi: 10.1086/505356
95. Shi M., Lin X.-D., Chen X., Tian J.-H., Chen L.-J., Li K., Wang W., Eden J.-S., Shen J.-J., Liu L., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature*, 2018, vol. 556, no. 7700, pp. 197–202. doi: 10.1038/s41586-018-0012-7
96. Shi M., Lin X.-D., Tian J.-H., Chen L.-J., Chen X., Li C.-X., Qin X.-C., Li J., Cao J.-P., Eden J.-S., Buchmann J., Wang W., Xu J., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 2016, vol. 540, no. 7634, pp. 539–543. doi: 10.1038/nature20167
97. Speranskaya A.S., Khafizov K., Ayginin A.A., Krinitsina A.A., Omelchenko D.O., Nilova M.V., Severova E.E., Samokhina E.N., Shipulin G.A., Logacheva M.D. Comparative analysis of Illumina and Ion Torrent high-throughput sequencing platforms for identification of plant components in herbal teas. *Food Control*, 2018, vol. 93, pp. 315–324. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.04.040
98. Speranskaya A.S., Lopatukhin A.E., Khafizov K., Ayginin A.A., Korneenko E.V., Kireev D.E., Shipulin G.A. Evaluation of MinION nanopore platform for HIV whole coding regions sequencing. *Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology: The Eleventh International Conference*, 2018. doi: 10.18699/BGRSSB-2018-059
99. Stano M., Beke G., Klucar L. viruSITE — integrated database for viral genomics. *Database*, 2016, vol. 2016, p. baw162. doi: 10.1093/database/baw162
100. Thomson E., Ip C.L.C., Badhan A., Christiansen M.T., Adamson W., Ansari M.A., Bibby D., Breuer J., Brown A., Bowden R., Bryant J., Bonsall D., Da Silva Filipe A., Hinds C., Hudson E., Klenerman P., Lythgow K., Mbisa J.L., McLauchlan J., Myers R., Piazza P., Roy S., Trebes A., Sreenu V.B., Witteveldt J., STOP-HCV Consortium, Barnes E., Simmonds P. Comparison of next-generation sequencing technologies for comprehensive assessment of full-length hepatitis C viral genomes. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, vol. 54, no. 10, pp. 2470–2484. doi: 10.1128/JCM.00330-16
101. Travers K.J., Chin C.-S., Rank D.R., Eid J.S., Turner S.W. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Res.*, 2010, vol. 38, no. 15, pp. e159–e159. doi: 10.1093/nar/gkq543
102. Tsangaras K., Wales N., Sicheritz-Pontén T., Rasmussen S., Michaux J., Ishida Y., Morand S., Kampmann M.-L., Gilbert M.T.P., Greenwood A.D. Hybridization capture using short PCR products enriches small genomes by capturing flanking sequences (CapFlank). *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 10: e109101. doi: 10.1371/journal.pone.0109101
103. Tweedy J., Spyrou M.A., Donaldson C.D., Depledge D., Breuer J., Gompels U.A. Complete genome sequence of the Human Herpesvirus 6A strain AJ from Africa resembles strain GS from North America. *Genome Announc.*, 2015, vol. 3, no. 1. doi: 10.1128/genomeA.01498-14
104. UFO Sequencing Consortium within the I-BFM Study Group, Forster M., Szymczak S., Ellinghaus D., Hemmrich G., Rühlemann M., Kraemer L., Mucha S., Wienbrandt L., Stanulla M., Franke A. Vy-PER: eliminating false positive detection of virus integration events in next generation sequencing data. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, no. 1. doi: 10.1038/srep11534
105. VanDevanter D.R., Warren P., Bennett L., Schultz E.R., Coulter S., Garber R.L., Rose T.M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, vol. 34, no. 7, pp. 1666–1671.
106. Venter J.C. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *Science*, 2004, vol. 304, no. 5667, pp. 66–74. doi: 10.1126/science.1093857
107. Wang Q., Jia P., Zhao Z. VirusFinder: Software for efficient and accurate detection of viruses and their integration sites in host genomes through next generation sequencing data. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 5: e64465. doi: 10.1371/journal.pone.0064465

108. Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T.-Y., Cotten M., Kelly M., Van Reeth K., Qiu Y., Simon G., Bonin E., Foni E., Chiapponi C., Larsen L., Hjulsgaard C., Markowska-Daniel I., Urbaniak K., Dürrwald R., Schlegel M., Huovilainen A., Davidson I., Dán Á., Loeffen W., Edwards S., Bublot M., Vila T., Maldonado J., Valls L., ESNIP3 Consortium, Brown I.H., Pybus O.G., Kellam P. Molecular epidemiology and evolution of influenza viruses circulating within European swine between 2009 and 2013. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 19, pp. 9920–9931. doi: 10.1128/JVI.00840-15
109. Weiss S., Witkowski P.T., Auste B., Nowak K., Weber N., Fahr J., Mombouli J.-V., Wolfe N.D., Drexler J.F., Drosten C., Klempa B., Leendertz F.H., Kruger D.H. Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 159–161. doi: 10.3201/eid1801.111026
110. Worthey E.A., Mayer A.N., Syverson G.D., Helbling D., Bonacci B.B., Decker B., Serpe J.M., Dasu T., Tschannen M.R., Veith R.L., Basehore M.J., Broeckel U., Tomita-Mitchell A., Arca M.J., Casper J.T., Margolis D.A., Bick D.P., Hessner M.J., Routes J.M., Verbsky J.W., Jacob H.J., Dimmock D.P. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet. Med.*, 2011, vol. 13, no. 3, pp. 255–262. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182088158
111. Wylie T.N., Wylie K.M., Herter B.N., Storch G.A. Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture. *Genome Res.*, 2015, vol. 25, no. 12, pp. 1910–1920. doi: 10.1101/gr.191049.115
112. Zhang Y.-Z., Shi M., Holmes E.C. Using metagenomics to characterize an expanding virosphere. *Cell*, 2018, vol. 172, no. 6, pp. 1168–1172. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.043
113. Zhao G., Krishnamurthy S., Cai Z., Popov V.L., Travassos da Rosa A.P., Guzman H., Cao S., Virgin H.W., Tesh R.B., Wang D. Identification of novel viruses using Virushunter — an automated data analysis pipeline. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 10: e78470. doi: 10.1371/journal.pone.0078470
114. Zheng L., Tang J., Clover G.R.G., Spackman M.E., Freeman A.J., Rodoni B.C. Novel genus-specific broad range primers for the detection of furoviruses, hordeiviruses and rymoviruses and their application in field surveys in South-east Australia. *J. Virol. Methods*, 2015, vol. 214, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.11.022

Авторы:

Хафизов К.Ф., к.б.н., руководитель научной группы, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; зав. лабораторией разработки новых методов геномики ФГБУ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью МЗ РФ, Москва, Россия;

Сперанская А.С., к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; научный сотрудник кафедры высших растений Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Мацвай А.Д., младший научный сотрудник отдела молекулярной диагностики, научная группа разработки новых методов диагностики на основе секвенирования следующего поколения ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; лаборант лаборатории исторической генетики, радиоуглеродного анализа и прикладной физики Московского физико-технического института, г. Долгопрудный, Московская область, Россия;

Шипулин Г.А., к.м.н., зам. директора по научно-производственной работе ФГБУ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью МЗ РФ, Москва, Россия;

Дедков В.Г., к.м.н., зам. директора по науке ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; ведущий научный сотрудник Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва, Россия.

Authors:

Khafizov K.F., PhD (Biology), Scientific Group Leader, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; Head of the Laboratory for the Development of New Genomics Methods, Center of Strategic Planning, Moscow, Russian Federation;

Speranskaya A.S., PhD, Researcher, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Researcher, Department of Higher Plants, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Matsvay A.D., Junior Researcher, Department of Molecular Diagnostics, Group for the Development of New Diagnostic Methods Based on Next-Generation Sequencing, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; Laboratory Assistant, Laboratory of Historical Genetics, Radiocarbon Analysis and Applied Physics, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation;

Shipulin G.A., PhD (Medicine), Deputy Director on Science and Production, Center of Strategic Planning, Moscow, Russian Federation;

Dedkov V.G., PhD (Medicine), Deputy Director on Science, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher, Martinsonsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.12.2018
Отправлена на доработку 27.05.2019
Принята к печати 04.06.2019

Received 14.12.2018
Revision received 27.05.2019
Accepted 04.06.2019

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *HOMINISSUIS* — ВОЗБУДИТЕЛЯ МИКОБАКТЕРИОЗА ЧЕЛОВЕКА

Д.А. Старкова, О.В. Нарвская

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

Резюме. Среди представителей большой группы нетуберкулезных микобактерий (более 180 видов), *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (*МАН*) обладает наибольшей вирулентностью и является одним из основных возбудителей микобактериоза легких у иммунокомпетентных лиц и диссеминированной формы инфекции у ВИЧ-инфицированных. В связи с ростом заболеваемости микобактериозом, особенно в условиях распространения ВИЧ-инфекции, приобретают актуальность исследования генетического контроля и механизмов вирулентности *M. avium*. Благодаря полной расшифровке нуклеотидной последовательности генома *M. avium* 104 стало возможным его использование в качестве референсного штамма при сравнении с другими геномами. Так, сравнительный анализ штаммов *МАН*, выделенных от больных легочной и диссеминированной формами микобактериоза, продемонстрировал различия в структуре генома, затрагивающие ключевые гены вирулентности. В обзоре представлены современные данные о генетических детерминантах вирулентности *МАН*, ассоциированных с начальной фазой инфицирования. Подробно рассмотрены семейства генов *mce* (mammalian cell entry), *mmp* (mycobacterial membrane proteins), *pe/ppr* и *esx*, обеспечивающих выживание *МАН* в клетках организма-хозяина с момента адгезии и проникновения в макрофаги. Приведены механизмы генетического контроля выживаемости *M. avium* в культуре макрофагов человека *in vitro* и в организме мышей *in vivo* в условиях токсического влияния активных форм кислорода, оксида азота, бактерицидных белков. Сохраняясь в латентном состоянии, *МАН* способны вызывать бактериемию и вторичное поражение органов и тканей. Бактерии *МАН*, связываясь с эпителиальными клетками, образуют микроагрегаты, что способствует инвазии в слизистую оболочку дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта, обеспечивая персистенцию в организме хозяина. Рассмотрены известные на данный момент генетические детерминанты, ответственные за формирование микроагрегатов и биопленок. Отмечены генетические и фенотипические особенности *МАН* (отсутствие корд-фактора, наличие плазмид, способность к «переключению» морфологических типов колоний) по сравнению с *M. tuberculosis*. Подчеркнута роль природной резистентности *M. avium* к большинству противотуберкулезных и других антибактериальных препаратов, обычно не применяющихся для лечения туберкулеза. Известно, что кларитромицин, азитромицин, рифабутин, этамбутол, амикацин и фторхинолоны малоэффективны при раздельном применении, поэтому лечение микобактериоза требует

Адрес для переписки:

Старкова Дарья Андреевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-49 (служебн.); 8 921 424-63-37 (моб.).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Contacts:

Daria A. Starkova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-21-49 (office); +7 921 424-63-37 (mobile).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Библиографическое описание:

Старкова Д.А., Нарвская О.В. Генетические детерминанты вирулентности и лекарственной устойчивости *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* — возбудителя микобактериоза человека // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 26–34. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1220

Citation:

Starkova D.A., Narvskaya O.V. Genetic determinants of virulence and drug resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* — a causative agent of mycobacteriosis in humans // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 26–34. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1220

© Старкова Д.А., Нарвская О.В., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GDO-1220>

использования комбинации из нескольких препаратов, хирургического вмешательства или сочетания обоих методов. Обсуждаются генетический контроль и механизмы формирования устойчивости штаммов *MAH* к вышеперечисленным антибиотикам.

Ключевые слова: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, микобактериоз, нетуберкулезные микобактерии, вирулентность, гены вирулентности, макрофаги, генетический контроль вирулентности, лекарственная устойчивость, патогенность, гены *mce*, гены *esx*, гены *mmp*, гены *pe/ppa*.

GENETIC DETERMINANTS OF VIRULENCE AND DRUG RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *HOMINISSUIS* — A CAUSATIVE AGENT OF MYCOBACTERIOSIS IN HUMANS

Starkova D.A., Narvskaya O.V.

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

Abstract. Among the members of the large group of non-tuberculous mycobacteria (comprising more than 180 species), *M. avium* subsp. *hominissuis* (*MAH*) is the most significant causative agent of pulmonary infection in immunocompetent individuals as well as disseminated infection in immunocompromised hosts, e.g. human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients. Due to increased incidence rate of mycobacteriosis, especially in HIV infection, much still need to be learnt about the *MAH* genetic control and virulence mechanisms. Deciphering the genome contents of the *M. avium* strain 104 (isolated from an AIDS patient with disseminated *MAH* disease) allowed to compare genome sequences of *M. avium* strains to gain insights into genomic diversity associated with variable hosts and environments. Comparative genome analysis of *MAH* strains isolated from patients with pulmonary and disseminated forms of mycobacteriosis revealed differences in the structure of the genome, affecting the key virulence genes. This review provides current data on the genetic determinants of *MAH* virulence associated with the initial phase of infection. Several mycobacterial virulence-associated gene families, such as *mce* (mammalian cell entry), *mmp* (mycobacterial membrane proteins), *pe/ppa* and *esx* expressed by *MAH* during human infection are thought to be crucial for adhesion, entry, survival, and reproduction inside host macrophages. The genetic mechanisms of *MAH* survival in human macrophage cell culture as well as mice exposed to toxic effects of reactive oxygen, nitric oxide, bactericidal proteins (cathelicidin) are discussed. The *MAH* survival in the latency-like state is important for pathogen dissemination. Some genetic and phenotypic features of *MAH* (absence of a cord factor, presence of plasmids, potential to “switch” morphological types of colonies) are compared with *M. tuberculosis*. In addition, we summarized current state of *MAH* drug discovery, a role of *MAH* intrinsic multidrug resistance, genetic control, as well as mechanisms underlying formation of resistance to various groups of antibiotics in *MAH* strains.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, mycobacteriosis, non-tuberculous mycobacteria, virulence, virulence genes, macrophages, genetic control of virulence, drug resistance, pathogenicity, *mce*, *esx*, *mmp*, *pe/ppa*.

Введение

Микобактериоз (лат. mycobacteriosis) — инфекционное заболевание животных и человека, возбудителями которого являются представители большой группы нетуберкулезных микобактерий (НТМБ). Из всех потенциально патогенных видов НТМБ (более 180), наибольшее клиническое значение имеет *M. avium* subsp. *hominissuis* (*MAH*) — возбудитель микобактериоза человека и животных [34].

Среди основных клинико-рентгенологических проявлений микобактериоза, вызванного *MAH*, чаще всего встречаются поражения периферических и внутригрудных лимфатических узлов и легких, сходные с туберкулезными [1, 2].

У иммунокомпетентных лиц входными воротами для *MAH* служат дыхательные пути. При аэрогенном заражении микобактерии колонизируют слизистую бронхов, вызывая поражение легких. Наличие предрасполагающих факторов зачастую способствует развитию инфекции. Так, к группам соматического риска

относят больных кистозным фиброзом, бронхоэктатической болезнью и пациентов, длительно получающих иммуносупрессивные препараты [1, 2, 44]. Повышен риск заболевания у лиц, имеющих профессиональные болезни легких (пневмокониоз и силикоз) и работающих в тесном контакте с сельскохозяйственными животными [2, 14].

При иммуносупрессии (в особенности у ВИЧ-инфицированных) входными воротами для *MAH* служит не только респираторный, но и желудочно-кишечный тракт. Бактерии *MAH*, попадая с пищей или водой в полость рта, способны сохраняться в кислой среде желудка и поражать слизистую кишечника. Находясь в латентном состоянии в лимфоузлах брюшной полости, *MAH* в дальнейшем могут вызывать бактериемию и вторичное поражение костного мозга, печени и селезенки (персистируют в макрофагах и купферовских клетках) [5, 35]. Диссеминированная форма инфекции является одним из самых частых осложнений у ВИЧ-инфицированных на поздних стадиях [2, 14].

Попав в макрофаги, *M. avium* противостоят токсическому влиянию активных форм кислорода, оксида азота, бактерицидных белков (кателицидин) и препятствуют слиянию фагосомы с лизосомой, активно размножаясь в макрофагах. Захват микобактерий макрофагами опосредован рецепторами комплемента CR3b, CR1, CR3, CR4, маннозо-фукозным и/или avb3 интегринами рецепторами и рецептором фибронектина [9, 16, 18, 23]. Через несколько суток инфицированный *МАН* макрофаг подвергается апоптозу, что, однако, не приводит к полной элиминации возбудителя. Бактерии *МАН* покидают апоптотные клетки макрофагов и инфицируют соседние, способствуя дальнейшей диссеминации возбудителя [5, 12]. Показано, что мутации в генах MAV_2235, MAV_2120, MAV_2410 и MAV_4563 нарушают способность бактерий *МАН* выходить из макрофагов при апоптозе [5].

Вирулентность *M. avium*

Степень патогенности (потенциальной способности микроорганизма вызывать инфекционное заболевание) каждого штамма определяется набором факторов вирулентности. Экспериментально установлено, что большие дозы возбудителя способствуют развитию инфекционного процесса у лабораторных животных. При этом из всех видов НТМБ *M. avium* обладает наибольшей вирулентностью [2].

Существует зависимость между вирулентностью *M. avium*, лекарственной устойчивостью и морфологическими типами колоний (гладкие/шероховатые, прозрачные/непрозрачные) [44]. Показано, что гладкие прозрачные колонии, доминирующие при первичном посеве на питательные среды, содержат бактерии, резистентные к большинству антибиотиков и вирулентные для лабораторных животных [13]. Шероховатые непрозрачные колонии *M. avium*, преобладающие при последующих пассажах культуры *in vitro*, содержат менее вирулентные бактерии [2, 7].

Фенотипической особенностью *МАН* является способность к переключению морфотипов колоний [44]. Основой морфологического изменения гладкого типа на шероховатый является утрата антигенной поверхностной структуры — гликопептидолипида (GPL) в результате делеции протяженного кластера генов *ser2*. Так, шероховатые морфотипы штаммов *МАН*, лишённые GPL, были выделены от больных СПИД с диссеминированной формой микобактериоза [13, 14, 25, 28].

Клинические изоляты *M. avium* подвергаются обратимому переключению между красным и белым морфотипами колоний на среде

с Конго красным (за это ответственна двухкомпонентная регуляторная система генов *mtrAB*) [7]. Белый морфотип отличается большей вирулентностью и резистентностью к антибиотикам по сравнению с красным типом [7, 13, 25].

В зависимости от профиля нуклеотидной последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) *16S-23S rRNA*, штаммы *M. avium* подразделяют на таксономические единицы — секвоары (Mav-A — Mav-H) [37]. Сообщается об ассоциации некоторых секвоаров *M. avium* с вирулентностью. Подавляющее большинство случаев микобактериоза у человека обусловлено штаммами *МАН* секвоаров Mav-A и Mav-B. Секвоар Mav-A вызывает в основном лёгочные инфекции у пожилых пациентов и шейный лимфаденит у детей, в то время как Mav-B связан с тяжёлыми диссеминированными формами инфекции у больных СПИД. Оба секвоара являются продуцентами большего количества гемолизина — важного фактора вирулентности — по сравнению с секвоарами остальных типов [14, 37].

Исследование антигенных свойств штаммов *M. avium*, выделенных от больных СПИД, выявило преобладание серотипов 4, 6, 8 и 11, которые характеризовались большей вирулентностью, чем другие серотипы в опытах *in vitro* и *in vivo* при заражении мышей [38, 45, 46].

Генетические детерминанты вирулентности *M. avium*

В связи с ростом заболеваемости микобактериозом, особенно в условиях распространения ВИЧ-инфекции, приобретают актуальность исследования генетического контроля и механизмов вирулентности *M. avium*.

Многие механизмы, используемые *МАН* для выживания в клетках организма-хозяина, аналогичны таковым у *M. tuberculosis*, однако существуют и различия. Так, у *M. avium* и других НТМБ отсутствует корд-фактор — важнейший среди многочисленных факторов вирулентности *M. tuberculosis* [1, 2]. В отличие от бактерий *M. tuberculosis*, которые способны покинуть вакуоль инфицированного макрофага, *МАН* остаются в клетках хозяина до начала апоптоза [5].

Геном *M. avium*, помимо хромосомной ДНК, включает внехромосомные генетические элементы — плазмиды (отсутствуют у *M. tuberculosis*), которые обеспечивают селективные преимущества при воздействии жестких условий окружающей среды. Так, у *МАН* выявлена уникальная плаزمиды pMAN135, которая содержит гены, ассоциированные с вирулентностью *МАН* и устойчивостью к противомикробным препаратам. Наибольшая частота носительства pMAN135

была отмечена у клинических изолятов *МАН* (практически не определялась у изолятов, полученных от свиней) [32, 41, 43].

Благодаря полной расшифровке нуклеотидной последовательности генома *M. avium* 104 стало возможным его использование в качестве референсного штамма при сравнении с другими геномами. Так, сравнительный анализ штаммов *МАН*, выделенных от больных легочной (*M. avium* ТН135) и диссеминированной (*M. avium* 104) формами микобактериоза, продемонстрировал различия в структуре генома, затрагивающие ключевые гены вирулентности [42].

К основным генам вирулентности патогенных микобактерий относят семейства генов *mce* (mammalian cell entry), *mmp* (mycobacterial membrane proteins), *pe/ppa* и *esx* (рис.) [22].

Отличительной особенностью микобактерий является высокое содержание липидов и восков в клеточной стенке, что играет ключевую роль во внутриклеточном выживании патогена. Известно, что белки MmpL и MmpS опосредуют транспорт липидных метаболитов для биосинтеза липидов клеточной стенки.

Геном штамма *МАН* ТН135 содержит все гены *mmpL* и *mmpS*, обнаруженные в геноме штамма *МАН*104, а также ТН135-специфичные гены *mmpL5* (*МАН*_0778), *mmpL5_5* (*МАН*_4506), *mmpL6* (*МАН*_3375), ген семейства *mmpL* (*МАН*_0016) и *mmpS4_1* (*МАН*_4505) [40]. Хотя роль генов *mmpL* у *M. avium* полностью не изучена, установлено, что инфицирование макрофагов *M. avium* связано с экспрессией транспортных белков MmpL, вероятно по аналогичному *M. tuberculosis* механизму [28].

Семейство микобактериальных генов *esx*, кодирующих белки системы секреции метаболитов VII типа, включает пять ESX-геномных локусов (ESX-1 — ESX-5). В частности, белки ESAT-6 и CFP-10, кодируемые ESX-1, участвуют в лизисе мембран фагосом, межклеточном распространении и являются ключевыми факторами вирулентности *M. tuberculosis* [11]. Характерной особенностью генома *МАН* является отсутствие локуса ESX-1 и наличие интактных локусов ESX-2 — ESX-5 с неполной гомологией в отношении генома *M. tuberculosis* [22, 42]. Инактивация ESX-5 приводит к потере

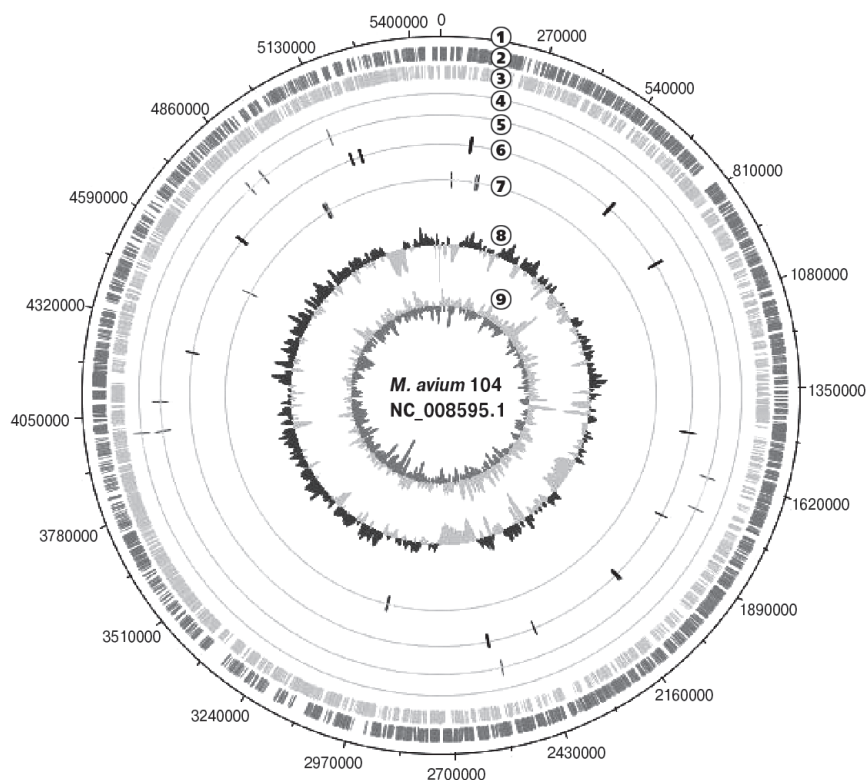


Рисунок. Локализация основных детерминант вирулентности на хромосоме *M. avium* 104

Figure. Localization of the main determinants of virulence on the chromosome *M. avium* 104

1 — шкала в п.н.; 2 — кодирующие участки на плюс-цепи; 3 — кодирующие участки на минус-цепи; 4 — локализация гена *mmpS*; 5 — локализация генов *mmpL*; 6 — локализация семейства генов *mce*; 7 — локализация семейства генов *esx*; 8 — GC состав (доля GC по отношению к длине ДНК, %); 9 — GC skew (отклонение по отношению суммы всех гуанинов к сумме всех цитозинов, (G-C)/(G+C)).

1 — scale, base pairs; 2 — coding DNA sequences (CDS) on the plus chain; 3 — CDS on the minus chain; 4 — localization of the *mmpS* gene; 5 — localization of *mmpL* genes; 6 — localization of the *mce* gene family; 7 — localization of the *esx* gene family; 8 — GC content scale; 9 — GC skew scale.

способности *M. avium* модулировать реакцию иммунного ответа с участием макрофагов [30].

Ряд белков, обнаруженных в инфицированных *МАН* макрофагах, кодировались генами, гомологичными *mce1* и *mce4* у *M. tuberculosis*. Эти гены входят в состав двух из четырех *mce*-оперонов, ассоциированных с вирулентностью микобактерий. Белок Mce1A способствует проникновению микобактерий в макрофаг, а продукты оперона *mce4* обеспечивают усвоение холестерина — важного источника энергии у микобактерий [22, 42].

Известно, что микобактерии имеют два родственных семейства генов *pe/ppr*. Наименования этих генов отражают присутствие ProGlu (PE) и ProProGlu (PPE) мотивов в консервативных доменах N-терминальной области соответствующих глицин-богатых белковых антигенов. Показано, что белки PE и PPE, экспрессируемые на поверхности бактериальных клеток, ассоциированы с вирулентностью микобактерий и формированием клеточного и гуморального иммунного ответа [22]. У трех подвидов *M. avium* — *МАН*, *ММА* и *МАР* — были выявлены 12 PE и 49 PPE ортологов [29]. Среди ортологов PPE особый интерес представляют гены MASPPE4 (MAV_0790) и MASPPE12 (MAV_2006), поскольку являются уникальными для штамма *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 [21, 26, 29]. Функциональная область ESX-5 генома *M. avium* обеспечивает экспорт ряда белков PE/PPE и является одной из основных детерминант вирулентности *M. avium*. Так, белок MAV_2928 (продукт гена PPE25-MAV области ESX-5) экспрессируется в ответ на низкое содержание питательных веществ в фагосоме и транслоцируется на поверхность бактериальной клетки. Инактивация гена PPE25-MAV приводит к нарушению способности микроорганизма реплицироваться внутри макрофагов и значительно ослаблению вирулентности как *in vitro*, так и *in vivo* [27, 30].

Как и многие патогенные бактерии, *МАН* способны связываться с эпителиальными клетками, что приводит к образованию микроагрегатов и инвазии в слизистую оболочку дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта, обеспечивая персистенцию в организме хозяина. Образование микроагрегатов предшествует образованию биопленок, что частично объясняет устойчивость *M. avium* к антибиотикам и рецидивирующий характер респираторных инфекций [3, 39].

Важную роль в формировании биопленок играют такие генетические детерминанты, как MAV_4604 и MAV_1406 [22], а также продукты генов кластера GPL (отвечает за синтез гликопептидолипида — одного из основных компонентов клеточной стенки микобактерий). Отмечено,

что у штаммов *M. avium* с мутациями в генах *sucA* (кодирует 6-оксидегидрогеназу), *pstB* (кодирует протеин-синтетазу) нарушается способность к формированию биопленок [20, 47].

Продукт гена MAV_3013 (MBP-1, англ. Microaggregate Binding Protein-1) участвует в адгезии микроагрегата к клеткам эпителия посредством взаимодействия с белком хозяина — виментином. L. Vabrak с соавт. (2015) выявили высокий уровень экспрессии гипотетического гена MAV_0831 (MIP-1, англ. Microaggregate Invasion Protein-1) в ходе формирования микроагрегатов. MIP-1 способствует эффективному проникновению сформировавшегося агрегата в эпителиальные клетки хозяина посредством взаимодействия с филамином А — актинсвязывающим структурным белком цитоскелета [3, 39, 47]. Продукты генов MAV_5138 и MAV_3679, регулируемые геном *fadD2* (кодирует ацил-КоА-синтетазу), ответственны за инвазию *МАН* в эпителиальные клетки [15].

Изучение генетического контроля вирулентности *M. avium* в культуре макрофагов человека *in vitro* и в организме мышей *in vivo* выявило некоторые детерминанты вирулентности, ассоциированные с начальной фазой инфицирования. Были идентифицированы гены, кодирующие белки, аналогичные белкам других микроорганизмов и участвующие в синтезе пиримидина (*carB*), полисахаридов (*udgA*) и микобактина (*mbtE* и *mbtF*), цикле трикарбоновых кислот (*icd* и *sucA*), глиоксалатном цикле (*icl*), нитрат-нитритном дыхании (*nirB* и *narK3*), переработке нуклеотидов и нуклеозидов (*add*), связывании/транспорте белков (*dppD*, *glnQ*), ДНК-репликации (*dnaZX*), синтезе нуклеотидов (*guaB3*), регуляции трансляции (*infB*, *greA*), деградации макромолекул (*lipL*) [9, 18].

Показано, что ген *mig* активно экспрессируется только в процессе размножения *M. avium* в макрофагах [9, 18, 33, 48].

Регуляторный белок OхuR индуцирует экспрессию генов, ассоциированных с ответной реакцией на действие оксидативного стресса, связанного с действием производных перекиси водорода в фагосомах [9, 40].

Выявлена высокая экспрессия гена *oppA* (MAV_0464) *M. avium* в печени, легких и селезенке мышей на ранних этапах инфицирования. Белки Opp отвечают за активный транспорт в бактериальную клетку олигопептидов, которые используются в качестве источников аминокислот и углерода. С этими белками взаимодействует гипотетический белок MAV_2941, который секретируется бактериальной клеткой в цитоплазму макрофагов *in vitro*. Мутации в генах *oppA* и MAV_2941 приводят к значительному подавлению роста бактерий в культуре макрофагов [10].

Также обнаружены гены (*mbtE* и *mbtF*) ферментов, участвующих в биосинтезе сидерофора микобактерии. Повышенная экспрессия данных генов наблюдается *in vivo* у микобактерий, находящихся внутри макрофагов, что связано с дефицитом ионов железа [18].

Экспрессия гомолога гена *icl* (изоцитрат-лиаза) *M. tuberculosis* была обнаружена при персистенции *M. avium* в макрофагах [17, 18].

Лекарственная устойчивость *M. avium*

M. avium обладает природной резистентностью к большинству противотуберкулезных и других антибактериальных препаратов, обычно не применяющихся для лечения туберкулеза. Установлено, что у *M. avium* полисахариды внешнего слоя клеточной стенки препятствуют диффузии химиотерапевтических препаратов внутрь клетки, поэтому условия, способствующие нарушению ее целостности, приводят к повышению лекарственной чувствительности микроба [2, 7, 44].

Такие препараты, как кларитромицин, азитромицин, рифабутин, этамбутол, амикацин и фторхинолоны малоэффективны при раздельном применении, поэтому лечение микобактериоза требует использования комбинации из нескольких препаратов, хирургического вмешательства или сочетания обоих методов [2].

Макролиды (кларитромицин и азитромицин) являются ключевыми лекарственными средствами для лечения микобактериоза, вызванного *МАН*. Механизм действия макролидов заключается в связывании с рибосомным туннелем большой субъединицы рибосомы бактериальной клетки, что нарушает освобождение растущей пептидной цепи от пептидилтрансферазного центра. Приобретенная антибиотикорезистентность почти всегда связана с мутацией в генах 23S рРНК, ответственных за связывание макролидов с рибосомами. Точечные мутации в положениях 2058 и 2059 в гене *rrl* 23S рРНК в большинстве случаев (80–100%) ассоциированы с устойчивостью к макролидам клинических изолятов *M. avium* [8, 19, 31, 44].

Аминогликозиды (канамицин, амикацин, гентамицин) связываются с 30S-субъединицей бактериальной рибосомы, нарушая процесс трансляции, что приводит к гибели клеток. У некоторых клинических изолятов *M. avium*, устойчивых к амикацину, встречается мутация A1408G в гене *rrs* 16S rRNA [6, 19].

Рифампицин (противотуберкулезный препарат первого ряда) связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы, кодируемой геном *rpoB*, блокируя удлинение цепи РНК. Устойчивость к рифампицину у *M. tuberculosis* связана с мутациями в области RRDR (rifampin

resistance-determining region) гена *rpoB*. В настоящее время у рифампицин-резистентных клинических изолятов *M. avium* не выявлено мутаций в области RRDR *rpoB*, что обуславливает необходимость поиска замен в геноме *МАН* за пределами данной области [19].

Этамбутол является одним из ключевых препаратов для лечения *МАН*-ассоциированных заболеваний. Этамбутол ингибирует биосинтез арабиногалактана — важнейшего компонента клеточной стенки, а устойчивость к этамбутолу ассоциирована с приобретенными мутациями в опероне *embCAB* (кодирует микобактериальную арабинозилтрансферазу) [19]. Устойчивость к этамбутолу *M. avium* связана со сверхэкспрессией генов *embAB* [4, 19].

Антибиотики группы фторхинолонов представляют особый интерес для лечения микобактериальной инфекции, так как активно действуют на возбудитель внутри клеток фагоцитов [2]. У *M. tuberculosis* большинство (~90%) устойчивых к фторхинолонам штаммов имеют мутации в области QRDR (quinolone resistance-determining region) генов *gyrA* и *gyrB* (кодируют ДНК-гиразу). Сообщается о некоторых мутациях в генах *gyrA* и *gyrB* у клинических изолятов *M. avium*, однако корреляции между однонуклеотидными заменами и резистентностью штаммов к фторхинолонам не выявлено [19, 24].

Обнаружено, что два гена — *pks12* (Maa1979) и Maa2520 — принимают участие в формировании лекарственной устойчивости у штаммов *M. avium*. В результате инсерционной мутации в локусе Maa2520 получены штаммы, чувствительные к ципрофлоксацину, кларитромицину, пенициллину и рифампицину. Они не образовывали лекарственно-устойчивых колоний по сравнению с диким предшественником и были чувствительны к минимальной ингибирующей концентрации препаратов. Ген Maa2520 кодирует гипотетические белки клеточной стенки, которые имеют высокую степень гомологии с белками *M. tuberculosis*, и, возможно, выполняют роль ее стабилизаторов [36]. Мутации в гене *pks12* (Maa1979) *M. avium* приводят не только к повышению лекарственной чувствительности ко всем вышеперечисленным препаратам, но также к изменению морфологии колоний (шероховатый тип). Продукт гена *pks12* штамма *M. avium* 104 на 87% гомологичен таковому микобактерий туберкулеза, участвует в синтезе фтиоцеролдимикоцерозата (DIM) — одного из основных компонентов клеточной стенки, обеспечивающих проницаемость [20, 36].

Таким образом, в связи с неуклонным ростом заболеваемости микобактериозом (особенно в условиях распространения ВИЧ-инфекции), резко возрастает необходимость исследования генетического контроля и механизмов виру-

лентности *M. avium*. При этом до сих пор остается открытым вопрос об источнике инфицирования и путях передачи инфекции. Полностью не изучены генетические механизмы и роль отдельных генов возбудителя в формировании иммунного ответа организма. Сведения о генах и мутациях в них, оказывающих влияние на возникновение лекарственной устойчивости штаммов *МАН*, малочисленны, поэтому попыт-

ки лечения больных с диссеминированными процессами, вызванными *M. avium*, в большинстве случаев оказываются безуспешными. Все это диктует необходимость дальнейшего изучения молекулярно-генетической структуры популяций *M. avium* различных подвидов с целью выявления молекулярных маркеров возбудителя, ассоциированных с клиническими проявлениями инфекции у человека.

Список литературы/References

1. Вишневский Б.И., Маничева О.А., Шеголева Р.А., Оттен Т.Ф. Вирулентность потенциально патогенных нетуберкулезных микобактерий. Обзор // Медицинский альянс. 2015. № 4. С. 5–14. [Vishnevskii B.I., Manicheva O.A., Shchegoleva R.A., Otten T.F. Virulence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria. Review. *Meditsinskii al'yans* = *Medical Alliance (Russia)*, 2015, no. 4, pp. 5–14. (In Russ.)]
2. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. СПб.: Медицинская пресса, 2005. 224 с. [Otten T.F., Vasil'ev A.V. *Mycobacteriosis*. St. Petersburg: *Meditsinskaya Pressa*, 2005. 224 p. (In Russ.)]
3. Babrak L., Danelishvili L., Rose S.J., Bermudez L.E. Microaggregate-associated protein involved in invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Virulence*, 2015, vol. 6, no. 7, pp. 694–703. doi: 10.1080/21505594.2015.1072676
4. Belanger A.E., Besra G.S., Ford M.E., Mikusová K., Belisle J.T., Brennan P.J., Inamine J.M. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, no. 21, pp. 11919–11924. doi: 10.1073/pnas.93.21.11919
5. Bermudez L.E., Danelishvili L., Babrack L., Pham T. Evidence for genes associated with the ability of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* to escape apoptotic macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, vol. 5, no. 63. doi: 10.3389/fcimb.2015.00063
6. Brown-Elliott B.A., Iakhiaeva E., Griffith D.E., Woods G.L., Stout J.E., Wolfe C.R., Turenne C.Y., Wallace R.J.Jr. In vitro activity of amikacin against isolates of *Mycobacterium avium* complex with proposed MIC breakpoints and finding of a 16S rRNA gene mutation in treated isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 10, pp. 3389–3394. doi: 10.1128/JCM.01612-13
7. Cangelosi G.A., Do J.S., Freeman R., Bennett J.G., Semret M., Behr M.A. The two-component regulatory system *mtrAB* is required for morphotypic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 2, pp. 461–468. doi: 10.1128/AAC.50.2.461-468.2006
8. Christianson S., Grierson W., Wolfe J., Sharma M.K. Rapid molecular detection of macrolide resistance in the *Mycobacterium avium* complex: are we there yet? *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 7, pp. 2425–2426. doi: 10.1128/JCM.00555-13
9. Danelishvili L., Poort M.J., Bermudez L.E. Identification of *Mycobacterium avium* genes up-regulated in cultured macrophages and in mice. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, vol. 239, no. 1, pp. 41–49. doi: 10.1016/j.femsle.2004.08.014
10. Danelishvili L., Stang B., Bermudez L.E. Identification of *Mycobacterium avium* genes expressed during in vivo infection and the role of the oligopeptide transporter *OppA* in virulence. *Microb. Pathog.*, 2014, vol. 76, pp. 67–76. doi: 10.1016/j.micpath.2014.09.010
11. Dumas E., Christina Boritsch E., Vandebogaert M., Rodríguez de la Vega R.C., Thiberge J.M., Caro V., Gaillard J.L., Heym B., Girard-Misguich F., Brosch R., Sapriel G. Mycobacterial pan-genome analysis suggests important role of plasmids in the radiation of type VII secretion systems. *Gen. Biol. Evol.*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 387–402. doi: 10.1093/gbe/evw001
12. Early J., Fischer K., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* uses apoptotic macrophages as tools for spreading. *Microb Pathog.*, 2011, vol. 50, no. 2, pp. 132–139. doi: 10.1016/j.micpath.2010.12.004
13. Eckstein T.M., Inamine J.M., Lambert M.L., Belisle J.T. A genetic mechanism for deletion of the *ser2* gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, no. 21, pp. 6177–6182. doi: 10.1128/jb.182.21.6177-6182.2000
14. Falkinham 3rd J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 9, no. 2, pp. 177–215.
15. Harriff M.J., Danelishvili L., Wu M., Wilder C., McNamara M., Kent M.L., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* genes MAV_5138 and MAV_3679 are transcriptional regulators that play a role in invasion of epithelial cells, in part by their regulation of *CipA*, a putative surface protein interacting with host cell signaling pathways. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 4, pp. 1132–1142. doi: 10.1128/JB.01359-07
16. Hayashi T., Rao S.P., Catanzaro A. Binding of the 68-kilodalton protein of *Mycobacterium avium* to alpha(v)beta3 on human monocyte-derived macrophages enhances complement receptor type 3 expression. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, no. 4, pp. 1211–1216.
17. Höner zu Bentrup K., Swenson D.L., Miczak A., Russell D.G. Characterization of isocitrate lyase activity and expression in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, no. 23, pp. 7161–7167.
18. Hou J.Y., Graham J.E., Clark-Curtiss J.E. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun.*, 2002, vol. 70, no. 7, pp. 3714–3726. doi: 10.1128/iai.70.7.3714-3726.2002
19. Huh H.J., Kim S.Y., Jhun B.W., Shin S.J., Koh W.J. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. *Infect. Genet. Evol.*, 2018, pii. S1567–1348(18)30784–6. doi: 10.1016/j.meegid.2018.10.003
20. Ignatov D., Kondratieva E., Azhikina T., Apt A. *Mycobacterium avium*-triggered diseases: pathogenomics. *Cell Microbiol.*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 808–818. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01776.x

21. Iwamoto T., Arikawa K., Nakajima C., Nakanishi N., Nishiuchi Y., Yoshida S., Tamaru A., Tamura Y., Hoshino Y., Yoo H., Park Y.K., Saito H., Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Infect. Genet. Evol.*, 2014, vol. 21, pp. 479–483. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.010
22. Jeffrey B., Rose S.J., Gilbert K., Lewis M., Bermudez L.E. Comparative analysis of the genomes of clinical isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* regarding virulence related genes. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 7, pp. 1063–1075. doi: 10.1099/jmm.0.000507
23. Khattak F.A., Kumar A., Kamal E., Kunisch R., Lewin A. Illegitimate recombination: an efficient method for random mutagenesis in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *BMC Microbiol.*, 2012, vol. 12, no. 204. doi: 10.1186/1471-2180-12-204
24. Kim S.Y., Jhun B.W., Moon S.M., Shin S.H., Jeon K., Kwon O.J., Yoo I.Y., Huh H.J., Ki C.S., Lee N.Y., Shin S.J., Daley C.L., Suh G.Y., Koh W.J. Mutations in *gyrA* and *gyrB* in moxifloxacin-resistant *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, vol. 62, no. 9: e00527–18. doi: 10.1128/AAC.00527-18
25. Krzywinska E., Bhatnagar S., Sweet L., Chatterjee D., Schorey J.S. *Mycobacterium avium* 104 deleted of the methyltransferase D gene by allelic replacement lacks serotype-specific glycopeptidolipids and shows attenuated virulence in mice. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 56, no. 5, pp. 1262–1273. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04608.x
26. Lahiri A., Sanchini A., Semmler T., Schäfer H., Lewin A. Identification and comparative analysis of a genomic island in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *FEBS Lett.*, 2014, vol. 588, no. 21, pp. 3906–3911. doi: 10.1016/j.febslet.2014.08.037
27. Li Y., Miltner E., Wu M., Petrofsky M., Bermudez L.E. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell Microbiol.*, 2005, vol. 7, no. 4, pp. 539–548. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00484.x
28. Li Y.J., Danelishvili L., Wagner D., Petrofsky M., Bermudez L.E. Identification of virulence determinants of *Mycobacterium avium* that impact on the ability to resist host killing mechanisms. *J. Med. Microbiol.*, 2010, vol. 59, pp 8–16. doi: 10.1099/jmm.0.012864-0
29. Mackenzie N., Alexander D.C., Turenne C.Y., Behr M.A., de Buck J.M. Genomic comparison of PE and PPE genes in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 4, pp. 1002–1011. doi: 10.1128/JCM.01313-08
30. McNamara M., Danelishvili L., Bermudez L.E. The *Mycobacterium avium* ESX-5 PPE protein, PPE25-MAV, interacts with an ESAT-6 family Protein, MAV_2921, and localizes to the bacterial surface. *Microb Pathog.*, 2012, vol. 52, no. 4, pp. 227–238. doi: 10.1016/j.micpath.2012.01.004
31. Moon S.M., Park H.Y., Kim S.Y., Jhun B.W., Lee H., Jeon K., Kim D.H., Huh H.J., Ki C.S., Lee N.Y., Kim H.K., Choi Y.S., Kim J., Lee S.H., Kim C.K., Shin S.J., Daley C.L., Koh W.J. Clinical characteristics, treatment outcomes, and resistance mutations associated with macrolide-resistant *Mycobacterium avium* Complex lung disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 11, pp. 6758–6765. doi: 10.1128/AAC.01240-16
32. Moriyama M., Ogawa K., Nakagawa T., Nikai T., Uchiya K. Association between a pMAH135 and the progression of pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium*. *Kekkaku*, 2016, vol. 91, no. 1, pp. 9–15.
33. Morszczek C., Berger S., Plum G. The macrophage-induced gene (*mig*) of *Mycobacterium avium* encodes a medium chain acyl-coenzyme A synthetase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2001, vol. 1521, no. 1–3, pp. 59–65.
34. Parte A.C. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, pp. 1825–1829. doi: 10.1099/ijsem.0.002786
35. Petrofsky M., Bermudez L.E. CD4+ T cells but Not CD8+ or gammadelta+ lymphocytes are required for host protection against *Mycobacterium avium* infection and dissemination through the intestinal route. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 5, pp. 2621–2627. doi: 10.1128/IAI.73.5.2621-2627.2005
36. Philalay J.S. Palermo C.O., Hauge A.K., Rustad T.R., Cangelosi G.A. Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, no. 9, pp. 3412–3418. doi: 10.1128/AAC.48.9.3412-3418.2004
37. Rindi L., Lari N., Garzelli C. Virulence of *Mycobacterium avium* Subsp. *hominissuis* Human Isolates in an in vitro Macrophage Infection Model. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2018, vol. 7, no. 1, pp. 48–52. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_11_18
38. Ritacco V., Kremer K., Laan T., Pijnenburg J.E., Haas P.E., Van Soolingen D. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1998, vol. 2, no. 3, pp. 242–251.
39. Rose S.J., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* biofilm attenuates mononuclear phagocyte function by triggering hyperstimulation and apoptosis during early infection. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 1, pp. 405–412. doi: 10.1128/IAI.00820-13
40. Sherman D.R., Sabo P.J., Hickey M.J., Arain T.M., Mahairas G.G., Yuan Y., Barry C.E. 3rd, Stover C.K. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, no. 14, pp. 6625–6629. doi: 10.1073/pnas.92.14.6625
41. Uchiya K., Takahashi H., Nakagawa T., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T., Ichikawa K., Nikai T., Ogawa K. Characterization of a Novel Plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *PLoS One*, 2015, vol.10, no. 2: e0117797. doi: 10.1371/journal.pone.0117797
42. Uchiya K., Takahashi H., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T., Ichikawa K., Nakagawa T., Nikai T., Ogawa K. Comparative genome analysis of *Mycobacterium avium* revealed genetic diversity in strains that cause pulmonary and disseminated disease. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 8: e71831. doi: 10.1371/journal.pone.0071831
43. Uchiya K., Tomida S., Nakagawa T., Asahi S., Nikai T., Ogawa K. Comparative genome analyses of *Mycobacterium avium* reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 39750. doi: 10.1038/srep39750
44. Wu M.L., Aziz D.B., Dartois V., Dick T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discov. Today*, 2018, vol. 23, no. 8, pp. 1502–1519. doi: 10.1016/j.drudis.2018.04.001
45. Yakus M.A., Good R.C. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 5, pp. 926–929.

46. Yakrus M.A., Reeves M.W., Hunter S.B. Characterization of isolates of *Mycobacterium avium* serotypes 4 and 8 from patients with AIDS by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, no. 6, pp. 1474–1478.
47. Yamazaki Y., Danelishvili L., Wu M., MacNab M., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 1, pp. 819–825. doi: 10.1128/AEM.72.1.819-825.2006
48. Yoon J.H., Kim E.C., Kim J.S., Song E.Y., Yi J., Shin S. Possession of the macrophage-induced gene by isolates of the *Mycobacterium avium* complex is not associated with significant clinical disease. *J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 58, no. 2, pp. 256–260. doi: 10.1099/jmm.0.001958-0

Авторы:

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

Нарвская О.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; научный консультант ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

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

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

Поступила в редакцию 10.06.2019
Отправлена на доработку 21.02.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 10.06.2019
Revision received 21.02.2020
Accepted 11.03.2020

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА, ОБУСЛОВЛЕННОГО *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

А.В. Лапштаева¹, Е.А. Живечкова², И.В. Сычев¹, И.В. Евсегнеева³, В.В. Новиков^{4,5}

¹ ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, медицинский институт, г. Саранск, Россия

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

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

⁴ ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

⁵ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно во всем мире регистрируется свыше 10 млн новых случаев туберкулеза. В Российской Федерации, по данным Федеральной службы государственной статистики, в 2017 г. на 100 тыс. населения зарегистрировано 109,8 случаев активного туберкулеза, из которых 41,3% имели запущенную форму заболевания. Повсеместная распространенность заболевания независимо от климатических условий обусловлена не только высокой выживаемостью *Mycobacterium tuberculosis*, но и способностью возбудителя длительно персистировать в организме человека и реактивироваться через неограниченный период времени. Итог инфицирования в значительной степени определяется иммунореактивностью самого организма-хозяина и его готовностью к развитию протективного иммунного ответа. Кроме того, уже после развития болезни состояние иммунной системы определяет и течение туберкулеза: либо в виде ограниченной формы, либо с обширным поражением легких и даже других органов, что наблюдается при генерализованной инфекции. В последние десятилетия большое внимание исследователей было направлено на изучение механизмов клеточного адаптивного иммунитета в патогенезе туберкулезной инфекции. Безусловно, адаптивный иммунитет является мощной защитой, обеспечивающей целенаправленный специфический иммунный ответ, однако в настоящее время становится понятным, что он является лишь эффекторным звеном врожденного иммунитета. Врожденный иммунитет — филогенетически более древняя, наследственно закрепленная система, основной задачей которой является обеспечение быстрой элиминации патогена и предотвращение развития инфекции на ранних стадиях, когда механизмы адаптивного иммунитета отсутствуют. Механизмы врожденного иммунитета представлены клетками, разнообразными рецепторами, молекулами и их комплексами, присутствующими на разных клетках и имеющими одинаковое предназначение. Активация врожденного иммунитета начинается с распознавания одинаковых групп молекул, присутствующих у различных па-

Адрес для переписки:

Лапштаева Анна Васильевна
430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, 68,
Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет им. Н.П. Огарева.
Тел.: 8 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Contacts:

Anna V. Lapshtaeva
430005, Russian Federation, Saransk, Bol'shevistskaya str., 68,
National Research Ogarev Mordovia State University.
Phone: +7 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Библиографическое описание:

Лапштаева А.В., Живечкова Е.А., Сычев И.В., Евсегнеева И.В.,
Новиков В.В. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии
инфекционного процесса, обусловленного *Mycobacterium
tuberculosis* // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 35–48.
doi: 10.15789/2220-7619-ROI-1169

Citation:

Lapshtaeva A.V., Zhivechkova E.A., Sychev I.V., Evsegneeva I.V., Novikov V.V.
Innate immune receptors in development of *Mycobacterium tuberculosis*
infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2020, vol. 10, no. 1, pp. 35–48. doi: 10.15789/2220-7619-ROI-1169

тогенов, — патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs), осуществляемого с помощью паттерн-распознающих рецепторов (pathogen recognition receptors — PRRs). В обзоре приводятся данные о роли рецепторов врожденного иммунитета в распознавании PAMPs, присущих *Mycobacterium tuberculosis*, в продукции иммунорегуляторных цитокинов и в активации сигнальных путей, играющих критическую роль в регуляции некроптоза, апоптоза и аутофагии инфицированных макрофагов. Рассматривается значение факторов врожденного мукозального иммунитета в реализации иммунного ответа на *M. tuberculosis*. Описано участие Toll-подобных и сквенджер-рецепторов, маннозного рецептора, DC-SIGN и других в развитии иммунитета против *M. tuberculosis*. Представлены данные о полиморфных вариантах генов врожденного иммунитета, формирующих предрасположенность к туберкулезу и оказывающих влияние на характер его течения.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, туберкулез, рецепторы врожденного иммунитета.

INNATE IMMUNE RECEPTORS IN DEVELOPMENT OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* INFECTION

Lapshataeva A.V.^a, Zhivechkova E.A.^b, Sychev I.V.^a, Evsegneeva I.V.^c, Novikov V.V.^{d,e}

^a National Research Ogarev Mordovia State University, Medical Institute, Saransk, Russian Federation

^b Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation

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

^d N.I. Lobachevskii National Research Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

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

Abstract. According to the World Health Organization, over 10 million new tuberculosis cases are reported annually worldwide. According to the 2017 Federal State Statistics Service Report, incidence rate for active TB infection in the Russian Federation was 109.8 cases per 100,000 population, of which 41.3% accounted for chronic disease form. Regardless of climatic conditions, high prevalence of TB infection, is not only due to high *Mycobacterium tuberculosis* viability, but also its ability for long persistence in human body and reactivation after an unlimited period of dormancy. The outcome of infection is largely determined by host immunoreactivity and its ability to develop protective immune response. In addition, status of immune system also underlies tuberculosis course after the onset: either as a localized form, or as a form with extensive damage to the lungs and even other organs observed in generalized infection. In recent decades, a great attention was paid to examining mechanisms of adaptive cell immunity played in pathogenesis of TB infection. No doubt, adaptive immunity is a powerful defense system providing a targeted specific immune response, but now it is becoming clear that it represents solely an effector arm of innate immunity. Innate immunity is a phylogenetically more ancient, inherited system largely aimed at ensuring rapid pathogen elimination and preventing development of infection at early stages when adaptive immunity ongoing antigen-specific maturation. Mechanisms of innate immunity mediated by cells, diverse receptors, molecules and their complexes, found on various cells. Activation of innate immunity begins with recognition of conserved molecular groups present in various pathogens called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are sensed by pathogen recognition receptors (PRRs). Here, we review current data on the role of innate receptors in recognizing *M. tuberculosis*-derived PAMPs, production of immunoregulatory cytokines and activation of signaling pathways playing a crucial role in the regulation of necroptosis, apoptosis and autophagy of infected macrophages. Significance of innate mucosal factors in implementing immune response to *M. tuberculosis* is discussed. In particular, Toll-like receptors, scavenger-receptors, mannose receptor, DC-SIGN etc. were described to participate in development of *M. tuberculosis* immunity. The data on single nucleotide polymorphic variants for innate genes are shown, which predispose to developing tuberculosis and affecting its course.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, receptors of innate immunity.

Несмотря на то что заболеваемость туберкулезом легких за последние 10 лет снизилась почти вдвое, он по-прежнему остается ведущей причиной смертности от инфекционных заболеваний во всем мире и занимает одно из лидирующих мест в структуре социально значимых заболеваний Российской Федерации [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно во всем мире регистрируется 10,4 млн новых случаев туберкулеза, а около 30% населения инфицированы *Mycobacterium tuberculosis*.

Итог инфицирования в значительной степени обусловлен иммунореактивностью самого организма-хозяина и его способностью к развитию протективного иммунного ответа.

M. tuberculosis использует различные факторы для развития инфекции, включая адгезию, инвазию, репликацию в клетках и дальнейшее распространение в организме [58]. К факторам патогенности *M. tuberculosis* относится способность синтезировать липиды клеточной стенки [78]. Некоторые виды липидов — трегалоза ди-

миколат (ранее называемый корд-фактором), диацелированный сульфогликолипид и липогликаны на основе маннана [маннозиды фосфатидил-мио-инозитола (PIM), миколовые кислоты, гликолипиды липоманнан (LM) и липоарабиноманнан (LAM)], — вызывают иммунопатологический ответ, тогда как другие (фтиоцеролдимикоцерозат, сульфолипид-1 и ди- и полиацилтрегалоза) ослабляют иммунный ответ организма и участвуют в защите *M. tuberculosis* от иммунного ответа [5, 69, 86, 87, 115].

Настоящий обзор посвящен анализу роли мукозального иммунитета, бронхолегочного эпителия и рецепторов врожденного иммунитета в развитии туберкулезной инфекции, в том числе на уровне мукозального иммунитета.

Мукозальный иммунитет

Важную роль в реализации иммунного ответа на *M. tuberculosis* выполняет бронхолегочный эпителий. М-клетки, расположенные в эпителии дыхательных путей, распознают и переправляют *M. tuberculosis* в назально- или бронхиально ассоциированную с ними лимфатическую ткань (NALT/BALT) [71]. Известно, что бронхиальный эпителий за счет индукции выработки β -дефензинов ограничивает выживание бактерий, однако, с другой стороны, пребывание в неокисленной поздней эндосомной вакуоли бронхиальных эпителиальных клеток облегчает персистенцию *M. tuberculosis* [42, 82]. Мембранные белки-синдеканы, расположенные на эпителиальных клетках альвеол, опосредуя адгезию и внедрение микобактерий, облегчают колонизацию патогенных штаммов, но в то же время способствуют выработке хемокинов и провоспалительных цитокинов [118].

Альвеолярные макрофаги составляют более 95% клеток, обнаруживаемых в бронхоальвеолярном лаваже, они тесно связаны с альвеолярным эпителием и располагаются в поверхностно-активном веществе (ПАВ), которое является важным иммуномодулятором [37]. Большинство альвеолярных макрофагов происходит из моноцитов периферической крови, которые мигрировали в дыхательные пути, где дифференцировались [37, 99]. Поверхностно-активное вещество в основном состоит из фосфолипидов, необходимых для уменьшения поверхностного натяжения легких, и из сурфактантных белков: SP-A, SP-B, SP-C, SP-D [89, 109]. SP-A и SP-D преимущественно экспрессируются эпителиальными клетками альвеолярного типа II [3] и, наряду с маннозосвязывающим лектином, представляют собой коллагеноподобные кальций-зависимые лектины С-типа, опосредующие процессы фагоцитоза различных патогенов, включая *M. tuberculosis*.

SP-A повышает экспрессию Toll-like рецепторов (TLR) 2 [12, 21] и индуцирует активность маннозного рецептора [47] на альвеолярных макрофагах, тем самым улучшая их способность распознавать и поглощать *M. tuberculosis*. Однако, как ни парадоксально, повышенная выработка SP-A ослабляет сигналы TLR2 и TLR4 в этих клетках, вследствие чего увеличивается персистенция внутриклеточно локализованных *M. tuberculosis*. Кроме того, SP-A уменьшает фосфорилирование I κ B α — ключевого регулятора активности NF- κ B и ядерной транслокации p65, что приводит к уменьшению секреции TNF в ответ на TLR-лиганды. SP-A также снижает уровень фосфорилирования сигнальных белков — членов семейства MAPK [29, 46].

Поверхностно-активное вещество легких, кроме уникальных белков (SP-A, SP-B, SP-C и SP-D), также содержит фосфолипиды и нейтральные липиды, необходимые для устойчивости стенок альвеол и защиты от патогенов. Местная модуляция SP-A при персистенции *M. tuberculosis* в легких опосредует «очистку» окисленных поверхностно-активных фосфолипидов (поглощение холестерина и окисленных липидов), способствуя хроническому течению туберкулеза [94].

Другой сурфактантный белок — SP-D — агглютинирует *M. tuberculosis*, связывая свои С-концевые лектиновые домены с терминальным олигосахаридом липогликана — липоарабиноманнаном — на поверхности *M. tuberculosis*, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию внутриклеточной киназы p38, активации транскрипционного фактора (NF- κ B) и соответственно усилению продукции провоспалительных цитокинов [40]. Помимо этого, присутствие белка SP-D может стимулировать активное слияние фагосом, содержащих *M. tuberculosis*, с лизосомами с образованием фаголизосом в макрофагах, не влияя, при этом, на образование реакционно-способных промежуточных продуктов кислорода в этих клетках [30].

Полиморфизмы генов, кодирующих SP-A и SP-D, считаются генетическими детерминантами для множества легочных инфекционных заболеваний, включая туберкулез легких [97]. Показано, что аллельные вариации генов SP-A [64] и SP-D [32] влияют на восприимчивость организма к туберкулезу в некоторых популяциях. Так, в Ханской популяции Китая [47] было выявлено, что G-аллель aa91, T-аллель aa140 и гаплотип 6A11-1A8 являются факторами риска развития туберкулеза легких, а протективными в отношении туберкулеза являются гаплотипы CGAAC-1A0 и 6A4-1A12.

Hsieh M.-H. с соавт. [47] изучали ассоциацию полиморфизмов гена SP-D с туберкулезом путем клонирования двух полиморфизмов SP-D:

C92T (rs721917) и A538G (rs2243639). Результаты их работы показывают, что вариант SP-D 92T (аминокислотный остаток 16, метионин), в отличие от варианта SP-D 92C (аминокислотный остаток 16, треонин), повышает восприимчивость организма к туберкулезной инфекции, поскольку имеет пониженную связывающую способность и ингибирует фагоцитоз *M. tuberculosis* в макрофагах.

Toll-like рецепторы

Взаимодействие между компонентами клеточной стенки *M. tuberculosis* и рецепторами на поверхности клеток организма имеет большое значение в патогенезе инфекции [88]. Основными паттерн-распознающими рецепторами при микобактериальной инфекции являются TLRs [48]. TLRs экспрессируются на различных иммунных клетках, включая альвеолярные макрофаги, моноциты, дендритные клетки, В-клетки, специфические типы Т-клеток и даже на фибробластах и эпителиальных клетках [51]. *M. tuberculosis* и компоненты ее клеточной стенки распознаются TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9 [45, 49, 79, 103], что приводит к MyD88-зависимой активации антибактериальных эффекторных путей и продукции NO-оксидазы, а также провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-12, хемокинов [73]. Такие гликолипиды *M. tuberculosis*, как липоарабиноманнан, липоманнан и фосфатидилинозитол маннозид, а также белок пролин-пролин-глутаминовой кислоты (PPE)-17 подают сигнал через гетеродимеры TLR2-TLR1 [41, 105]. При этом показано, что миколовые кислоты могут ингибировать TLR2 в альвеолоцитах 1 и 2 типа и альвеолярных макрофагах [93]. TLR, экспрессируемые на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК), индуцируют воспалительный ответ клеток, однако длительная передача сигнала через TLR2, TLR4 и TLR9 ингибирует обработку и презентацию антигена молекулами МНС II класса. Причиной длительной сигнализации может служить персистенция *M. tuberculosis* и лигандов бактерии в фагосоме внутри клетки. Внутриклеточная персистенция *M. tuberculosis* (24 ч и более) блокирует реакцию макрофагов на IFN γ и способствует постоянной стимуляции TLR2, индукции IL-10 и клеток Th2 типа [81].

Микобактериальная инфекция усиливает экспрессию TLR2 на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей. При этом через TLR2 эпителиальных клеток индуцируются сигналы, приводящие к усилению секреции хемокина CXCL8 и провоспалительного цитокина IL-6, привлекающего нейтрофилы в легкие.

Приходящие нейтрофилы в свою очередь секретируют моноцитарный хемотаксический фактор CCL2 и провоспалительный цитокин TNF α , что привлекает моноциты [59].

Konowich J. с соавт. [54] выявили, что мыши, дефицитные по TLR2 (TLR2-knockout mice), при хронической туберкулезной инфекции неспособны поддерживать стабильную бактериальную нагрузку, о чем свидетельствует развивающаяся иммунопатология у мышей, проявляющаяся пневмонитом и усиленной клеточной инфильтрацией.

Предполагается, что активация макрофагов через TLR2 является одним из основных механизмов, активирующих витамин D3-зависимый путь кателицидина LL-37, участвующего в киллинге внутриклеточной *M. tuberculosis* [59]. Антимикробный пептид кателицидин экспрессируется в альвеолярных макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эпителиальных клетках [83]. Его экспрессия зависит от супероксид-продуцирующего белка семейства NADPH-оксидазы 2 (NOX2). Показано, что белок NOX2 способен осуществлять внутриклеточный контроль *M. tuberculosis* через TLR2/1-опосредованную экспрессию кателицидина в человеческих макрофагах в присутствии экзогенно добавленной активной формы витамина D3 (1,25-дигидроксивитамина D3) [95]. Взаимодействие NOX2 с TLR2 способствует как запуску врожденного иммунитета путем генерации активных форм кислорода, так и адаптивного иммунитета за счет регуляции презентации антигенов дендритными клетками CD8-положительным Т-клеткам [114].

TLR2 участвуют в рекрутировании в легкие Т-регуляторных клеток (Treg), которые ограничивают приток нейтрофилов и макрофагов, тем самым способствуя ограничению воспаления [67]. Накопление Treg в легких способствует поддержанию целостности туберкулезной granulомы при хронической инфекции [54].

Bandyopadhyay U. с соавт. показали, что белок *M. tuberculosis* Rv3529c имеет существенное сходство с доменом адаптерного белка TLR2 — MyD88. Rv3529c ингибирует TLR2-индуцированное взаимодействие MyD88 с IRAK1 и, как следствие, TLR2-опосредованные провоспалительные реакции. Снижается фосфорилирование MAPK-ERK и активация транскрипционного фактора NF- κ B; уменьшается секреция провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-6, а также IL-17A и увеличивается выработка противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β ; нарушается слияние фагосом с лизосомами внутри макрофагов и их апоптоз; ослабляется оксидативный «взрыв» [9]. С помощью такого механизма *M. tuberculosis* может мимикрировать и подавлять иммунный ответ организма.

В последние годы был идентифицирован и охарактеризован такой белок клеточной стенки *M. tuberculosis*, как Rv1016с. Липопротеин Rv1016с является еще одним лигандом TLR2 и способен индуцировать апоптоз макрофагов. Кроме того, Rv1016с TLR2-зависимым способом ингибирует IFN γ -индуцированную экспрессию молекул МНС класса II на макрофагах. Трансактиватор класса II (СИТА) регулирует экспрессию МНС II. Было показано, что липопротеин Rv1016с уменьшает IFN γ -индуцированную экспрессию СИТА через TLR2 и сигнализацию через MAPK. TLR2-зависимый апоптоз и ингибирование презентации антигена молекулами МНС II класса, индуцированные Rv1016с при микобактериальной инфекции, могут приводить к высвобождению остаточных бацилл из апоптотических клеток и снижению распознавания антигенов CD4⁺ Т-клетками. Эти механизмы позволяют внутриклеточной *M. tuberculosis* избегать иммунного надзора и поддерживать хроническую инфекцию [73].

Известно, что в ответ на инфицирование *M. tuberculosis* активируется также TLR4 [92]. Cardoso de Oliveira с соавт. показали, что у пациентов с туберкулезной инфекцией TLR4 экспрессируется на макрофагах в более высокой степени, чем у здоровых людей [26]. На дендритных клетках повышение активности TLR4 и, соответственно, фактора транскрипции NF- κ B приводит к продукции провоспалительного цитокина TNF α и двух важных лигандов для костимулирующих молекул — CD80 и CD86 [111]. Кроме того, взаимодействие *M. tuberculosis* и TLR4 приводит к активации TPL-2-зависимого MAP-киназного пути, результатом чего является повышение продукции IFN γ и экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, а также снижение продукции противовоспалительного цитокина IL-10 [73, 76, 84]. Липополисахарид клеточной стенки *M. tuberculosis* через TLR4/MyD88-зависимый путь активирует NOX2 в макрофагах, вследствие чего увеличивается продукция активных форм кислорода и других бактерицидных веществ. Результатом такой активации макрофагов является непосредственно повреждение *M. tuberculosis* и инициация аутофагии [62].

TLR7 активируется на макрофагах, инфицированных *M. tuberculosis*. При этом повышенная активация TLR7 благоприятно влияет на увеличение жизнеспособности *M. tuberculosis*-инфицированных клеток, тогда как подавление TLR7 вызывает снижение их жизнеспособности. Вероятно, активация TLR7 способствует удалению внутриклеточного патогена через аутофагию. Активация TLR7 и ядерного бел-

ка аутофагии LC3-II приводит к значительному увеличению аутофагосом в *M. tuberculosis*-инфицированных макрофагах. Подавление активации TLR7 приводит к уменьшению белка LC3-II в *M. tuberculosis*-инфицированных макрофагах и блокированию образования аутофагосомы [10].

Альвеолярные макрофаги и моноциты экспрессируют высокие уровни TLR9 [80]. В нескольких работах было высказано предположение, что TLR9 является важным рецептором для оптимальной реализации механизмов врожденного иммунного ответа против *M. tuberculosis* [34, 75, 79]. Посредством стимуляции TLR9, связывающего ДНК *M. tuberculosis*, индуцируется продукция кателицидина LL-37 — катионного антимикробного белка человека (hCAP18), который помимо прямой антимикробной функции выполняет несколько функций медиатора воспаления [80].

Показано, что у лиц, имеющих активную форму туберкулеза, существует дефект передачи сигналов через TLR9. Также у больных с активной формой туберкулеза отмечена пониженная секреция IL-8 [80].

Связь полиморфизмов генов TLRs с туберкулезом легких проявляется по-разному в популяциях в зависимости от этнической принадлежности и географического расположения. Исследования, проведенные среди индонезийского и турецкого населения, показали, что полиморфизм Arg753Gln гена TLR2 является фактором риска активного туберкулеза легких [25, 96], а у тунисских и корейских пациентов, полиморфный вариант Arg677Trp ассоциируется с туберкулезом легких [13]. У китайского населения не было выявлено ассоциации полиморфизмов TLR2 и TLR4 с развитием туберкулеза легких [110].

Полиморфный локус rs4986791 TLR4 имеет ассоциацию с повышенной восприимчивостью *M. tuberculosis* у африканцев, а полиморфный локус rs352139 TLR9 — у азиатов [90, 117]. В Индии аллель А rs352140 в гене TLR9 чаще обнаруживался у здоровых лиц, чем у больных туберкулезом [70]. Аллель С локуса rs187084 гена TLR9 связана с восприимчивостью к *M. tuberculosis* у индийского племени Байга [14].

DC-SIGN

DC-SIGN (CD209) представляет собой трансмембранный белок, относящийся к лектинам II типа, экспрессирующийся преимущественно на дендритных клетках, однако при туберкулезной инфекции индуцируется также и на альвеолярных макрофагах [101].

Внеклеточная часть рецептора DC-SIGN представлена единственным доменом CRD

(на С-конце), способным распознавать маннозосодержащие части поверхностных структур *M. tuberculosis*, такие как маннозный липоарабиноманнан, липоманнан, арабиноманнан, также гликопротеины и PIM [60]. Цитоплазматический домен (на N-конце) содержит три мотива, которые участвуют в фагоцитозе, внутриклеточном транспорте микобактерий и индукции сигналов [8, 31].

Результаты исследований, посвященные изучению роли рецептора DC-SIGN в развитии туберкулезной инфекции не являются однозначными. С одной стороны, данный рецептор проявляет провоспалительные функции, усиливая презентацию антигенов дендритными клетками человека через молекулы MHC I и II классов и индуцируя активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. DC-SIGN опосредует также фагоцитоз *M. tuberculosis* дендритными клетками и в дальнейшем способствует переносу микобактериальных гликолипидов на клеточную плазматическую мембрану, где гликолипиды могут быть загружены на CD1 молекулы для представления лимфоцитам [102].

С другой стороны, показано, что DC-SIGN, распознавая маннозный липоарабиноманнан (ManLAM), индуцирует продукцию иммуносупрессивного медиатора IL-10 и противодействует провоспалительному ответу, запущенному через TLR, в частности TLR4 [36]. Известно, что IL-10 ингибирует экспрессию костимулирующих молекул и продукцию IL-12, которые необходимы для активации иммунного ответа по Th-1 пути. Таким образом, *M. tuberculosis*, используя DC-SIGN, способны предотвращать активацию дендритных клеток через TLR и, тем самым, уклоняются от иммунного ответа.

Кроме того, было выявлено, что дефицит DC-SIGN на клетках человека напрямую улучшает контроль над *M. tuberculosis*. В отсутствие этого белка IL-4-активированные макрофаги проявляли провоспалительный фенотип при заражении *M. tuberculosis* и приобретали лучшую способность контролировать внутриклеточный рост этого патогена. Однако в отсутствие DC-SIGN при туберкулезной инфекции отмечалось снижение восстановления и ремоделирования тканей — процессов, являющихся характерными функциональными проявлениями деятельности альтернативно активированных макрофагов [61].

У жителей Южной Африки была выявлена ассоциация двух полиморфных вариантов в промоторной области DC-SIGN (–871A/G и –336A/G) с ответом организма на *M. tuberculosis*. Аллели –871G и –336A гена DC-SIGN играют протективную роль во время туберкулезной инфекции за счет повышенной экспрессии рецептора DC-SIGN на макрофагах и дендритных клетках [11].

Экспрессия данного рецептора на дендритных клетках у больных активными формами туберкулеза приводит к лучшему захвату и обработке микобактериальных антигенов, к более сильному ответу Т-клеток, а экспрессия на альвеолярных макрофагах — к усилению фагоцитоза *M. tuberculosis* макрофагами.

В то же время исследования по изучению распределения частот генотипов полиморфизма гена DC-SIGN, проведенные среди жителей России и Колумбии, не выявили достоверных различий между группами больных туберкулезом и здоровым контролем [2, 38]. Стоит отметить, что проведенное в России исследование показало, что у пациентов, пораженных «пекинским» генотипом (генотип Beijing с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*), было обнаружено достоверное снижение встречаемости –336G аллеля гена DC-SIGN. При сравнении распространенности –336G аллеля гена DC-SIGN выяснено, что в популяции жителей Иркутской области данный вариант гена встречался несколько реже, чем у европейцев, но чаще, чем у азиатов [2, 4]. У канадцев и коренных африканцев также выявлены ассоциации между аллельными вариантами однонуклеотидных полиморфизмов гена DC-SIGN и восприимчивостью к туберкулезу легких [15].

Исходя из того, что при инфицировании *M. tuberculosis* TLR2-опосредованная активация за счет включения NF-κB приводит к значительной экспрессии IL-12, тогда как стимуляция DC-SIGN обладает противоположным эффектом, Gupta D. с соавт. предположили, что на начальных стадиях заражения *M. tuberculosis*, когда нагрузка патогенных микроорганизмов низкая, срабатывают рецепторы TLR2, вызывая протективный иммунитет и предотвращая развитие активной формы туберкулеза. При увеличении бактериальной нагрузки в последующие периоды инфекции маннозный липоарабиноманнан связывается с DC-SIGN и запускает супрессорный ответ [39]. Одним из механизмов супрессии является высокая экспрессия SOCS1 (одного из супрессоров передачи цитокиновых сигналов), способствующая снижению уровня транскрипции цитокинов, в том числе и IL-12 [98].

Скавенджер-рецепторы

На поверхности альвеолярных макрофагов экспрессируются также скавенджер-рецепторы (scavenger receptors, SR): рецептор макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO) и скавенджер-рецептор класса А (SR-A), участвующие в поглощении неопсонизированного *M. tuberculosis* макрофагами [88]. MARCO, взаимодействуя с гликолипидом клеточной стенки

M. tuberculosis — трегалоза-6,6'-димиколятом (TDM), в совокупности с CD14 активирует сигнальный путь TLR2. Взаимодействие MARCO—лиганд показывает, что только MARCO недостаточно для связывания TDM. Другие паттерн-распознающие рецепторы, присутствующие на поверхности макрофагов, также необходимы для связывания и эффективного иммунного ответа [16]. CD14 компонент рецепторных комплексов CD14/TLR2 и MD2/TLR4/CD14 экспрессируется на макрофагах и моноцитах, участвует в распознавании таких микобактериальных лигандов, как пептидогликан, липотейхоевая кислота, липопроотеины и липоарабиноманнан. Было показано, что в молекула CD14 в составе вышеуказанных рецепторных комплексов облегчает поглощение неопсонизированных микобактерий [74]. При связывании с лигандами *M. tuberculosis*, CD14 взаимодействует с TLR2, чтобы индуцировать передачу сигнала на ядерный фактор NF-κB и запустить синтез провоспалительных цитокинов [43].

Однако при острой форме туберкулезной инфекции отсутствие рецепторов SR-A и MARCO у SR-A и/или MARCO-дефицитных мышей не влияло на иммунный ответ организма, не нарушало образование и структурирование гранул и не приводило к чрезмерному воспалению легких [24].

У мышей с нокаутом по гену CD14 при заражении вирулентным *M. tuberculosis* H37Rv было отмечено уменьшение воспалительной реакции в легких, что позволило мышам выжить [108].

Проведена оценка связи полиморфизмов промотора гена CD14 с восприимчивостью к туберкулезу легких у жителей Китая. Между пациентами с туберкулезом и здоровым контролем были обнаружены статистически значимые различия в распределении полиморфных маркеров G1619A, T1359G, A1145G и C159T. Гаплотип GGGT, включающий варианты четырех вышеперечисленных SNP, показал значительную связь с этим заболеванием [112].

Мезенхимальные стволовые клетки человека (MSCs) экспрессируют на своей поверхности два типа скавенджер-рецепторов: MARCO и SR-B1, с помощью которых индуцируют фагоцитоз *M. tuberculosis*. Продемонстрировано, что размножение *M. tuberculosis* в MSCs не происходит вследствие аутофагии и продукции NO [52].

CD36 относится к скавенджер-рецепторам класса В и выполняет гомеостатическую функцию в легких на раннем этапе инфекции *M. tuberculosis*. Как известно, *M. tuberculosis* может использовать липиды в качестве источника углерода во время инфекции. Было выявлено, что липиды ПАВ и/или SP-A усиливают продукцию белка CD36 в альвеолярных макрофагах. Молекула CD36 функционирует

как рецептор поглощения липидов ПАВ макрофагами. Нокаут гена, кодирующего молекулу CD36, снижает поглощение дипальмитилфосфатидилхолина, наиболее распространенного вида липидов ПАВ [28]. Показано, что чувствительность макрофагов к микобактериальной инфекции значительно снижена у мышей с дефицитом CD36, и это может являться причиной длительной персистенции *M. tuberculosis* [44].

Маннозный рецептор

Еще одним важным рецептором, экспрессируемым на альвеолярных макрофагах и дендритных клетках, является маннозный рецептор (MP) CD206. Он представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа семейства лектинов C-типа [68].

Маннозный рецептор отличается наличием во внеклеточной части 8 доменов распознавания углеводов (CRD), которые связывают терминальные фрагменты липоарабиноманнана *M. tuberculosis* — маннозные радикалы [6]. С использованием первичных и перевиваемых клеточных линий проанализировано взаимодействие PIM клеточной стенки *M. tuberculosis* и MP. Показано, что с маннозным рецептором взаимодействует как маннозный липоарабиноманнан PIM5f, так и липоарабиноманнан PIM6f. Характер взаимодействия напрямую связан со степенью их ацилирования, вследствие этого с маннозным рецептором макрофагов предпочтительно связываются триацилированные формы PIM более высокого порядка (PIM5f и PIM6f). Напротив, PIM нижнего порядка (PIM2f) и липоманнан (LM) не распознаются маннозным рецептором [104]. В то же время показано, что PIM2f взаимодействует с неопсоническим доменом рецептора комплемента — CR3 [107].

Маннозный рецептор, функционируя как паттерн-распознающий рецептор, распознает и опосредует загрузку микобактериального липогликана, маннозного липоарабиноманнана на молекулы CD1 для представления антигенпрезентирующим клеткам [89].

Другими поверхностными маннозилированными молекулами *M. tuberculosis*, которые являются потенциальными лигандами для маннозного рецептора, являются арабиноманнаны, маннопротеины, фосфорилированный арабиноманнан и маннан [63]. Микобактериальные поверхностные маннозилированные молекулы играют важную роль в регуляции фагоцитоза и реакции хозяина. Известно, что ManLAM у *M. tuberculosis* ингибирует слияние фагосомы с лизосомой в макрофагах. В дополнение к ManLAM, PIM высокого порядка связывают-

ся с маннозным рецептором, что также ограничивает слияние фагосомы с лизосомой [104].

Кальмодулин и Ca^{2+} /кальмодулинкиназа II являются ключевыми молекулами, ответственными за формирование бактерицидных фаголизосом. Предполагают, что ManLAM блокирует увеличение уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле макрофагов [55] и тем самым препятствует взаимодействию фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) с кальмодулином, необходимым для образования фосфатидилинозитол-3-монофосфата (PI3P), вовлеченного в привлечение раннего эндосомального антигена 1 в фагосомы [22, 33, 50]. Вследствие этого, после фагоцитоза *M. tuberculosis* остается в фагосоме, которая не созревает в фаголизосому.

Важно отметить, что МР-опосредованное лигирование с помощью ManLAM и поглощение *M. tuberculosis* благоприятствуют выживанию бактерий, формируя противовоспалительную иммуносупрессирующую программу: ингибируется продукция макрофагов, дендритных клеток, провоспалительного цитокина IL-12 [20, 72] и иницируется выделение противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-10, IL-13 [27, 65]. Помимо этого, не стимулируется активация NO-синтазы, из-за чего происходит усиление ростовой активности микобактерий [20]. В целом взаимодействие с маннозным рецептором используется патогенными микобактериями для создания благоприятной среды внутри клетки-хозяина, микобактериальной фагосомы.

Маннозосвязывающий лектин

Маннозосвязывающий лектин (МСЛ) представляет собой острофазный сывороточный белок печеночного происхождения [66]. Он распознает микробные поверхностные углеводы, в том числе микобактериальные несущие маннозу гликопротеины (липоарабиноманнан), связывается с ними и способствует опсонофагоцитозу. Результаты исследований о роли этого белка в развитии туберкулезной инфекции расходятся. По мнению одних авторов [35, 100] низкие уровни МСЛ играют протективную роль; по мнению других [91] — высокие уровни МСЛ, действующего как опсонин, иницируют лектиновый путь активации комплемента [77] и активируют независимый от комплемента фагоцитоз, тем самым способствуя воспалению с продукцией соответствующих цитокинов. Низкий уровень этого белка в сыворотке может способствовать восприимчивости к туберкулезу.

У человека МСЛ кодируется геном, расположенным на хромосоме 10 в области 10q21-24. Известно, что среди жителей Италии пара гаплотипов NYA/NYA обеспечивает устойчивость организма к туберкулезу органов дыхания, тог-

да как другая пара — LYB/LYD способствует высокой восприимчивости [18]. Показано, что у представителей иранской популяции генотип МСЛ (НН) и аллель Н также вовлечены в восприимчивость к развитию туберкулеза легких, а наличие аллели L способствует устойчивости к этому заболеванию [100]. Однако при обследовании турецких пациентов с туберкулезом органов дыхания не было обнаружено взаимосвязи с полиморфизмом гена МСЛ [7, 19].

NOD-рецепторы

Члены семейства NOD-подобного рецептора (NLR) играют важную роль во врожденном иммунитете, индуцируя воспалительный ответ и регулируя пути гибели/выживания клеток. Они относятся к внутриклеточным рецепторам и представляют собой вторую линию распознавания патогенов *M. tuberculosis*, индуцируя провоспалительный ответ в макрофагах [23, 56]. NLR в основном экспрессируются на антиген-презентирующих клетках: дендритных клетках, макрофагах, а также на эпителиальных клетках. Рецептор NOD1 распознает специфические муропептиды, обнаруженные в пептидогликановом слое грамположительных бактерий, в том числе *M. tuberculosis*. NOD2 распознает N-гликозилированную форму мурамилдипептида (GMDP), обнаруженную у *M. tuberculosis*. После связывания они активируют митоген-активированные протеинкиназы (МАРК), ряд транскрипционных факторов, в том числе NF-κB и AP-1, что приводит к продукции клетками провоспалительных цитокинов [23].

Brooks с соавт. [17] при исследовании макрофагального звена у больных туберкулезом выявили, что NOD2-рецепторы больше экспрессируются на моноцитарных, чем на альвеолярных макрофагах. Они предположили, что низкая экспрессия NOD2 на альвеолярных макрофагах представляет собой фенотипический маркер альтернативно активированных макрофагов, что приводит к менее эффективному киллингу *M. tuberculosis* при первом контакте с возбудителем. С другой стороны, при последующем течении заболевания NOD2-рецепторы играют важную роль в защите клеток организма, поскольку уровни мРНК NOD2 увеличиваются у лиц, больных туберкулезом.

Продемонстрировано, что одновременная активация TLR4 и NOD-2-рецепторов дендритных клеток приводит к более сильному иммунному ответу и ограничению роста *M. tuberculosis*. Основными результатами синергетической работы этих рецепторов являются: ускорение активации дендритных клеток; увеличение экспрессии CCR7, приводящее к улучшению миграции дендритных клеток в лимфатические узлы

и представлению ими антигенов Т-лимфоцитам, повышение секреции $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и продукции NO дендритными клетками [53].

Дектин-1

Дектин-1 (CLEC7A) представляет собой трансмембранный белок типа II, экспрессируемый на макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах и регулирующий провоспалительные реакции на микробные патогены. Этот рецептор взаимодействует с микобактериями совместно с TLR2, индуцирует передачу сигналов через NF- κ B с выделением таких цитокинов, как $TNF\alpha$ и IL-12p40. До сих пор не были идентифицированы специфические микобактериальные лиганды для Дектина-1, хотя известно, что его внеклеточный лектиновый домен распознает β -1,3- и β -1,6-связанные глюкозы растительного и грибкового происхождения [57, 85, 113].

Обнаружено, что Дектин-1 совместно с TLR4 участвуют в *M. tuberculosis*-индуцированной продукции IL-17A. Предполагается, что связывание *M. tuberculosis* с Дектином-1 незрелой дендритной клетки способствует образованию зрелой дендритной клетки, продуцирующей $TNF\alpha$, IL-1, IL-6 и IL-23 и направляющей $CD4^+$ Т-клетки (Th1/Th17-лимфоциты) на продукцию $IFN\gamma$ и IL-17 [106, 116].

Заключение

Не вызывает сомнения, что рецепторы врожденного иммунитета играют важную роль в развитии иммунитета против *M. tuberculosis*. Исследования последних лет демонстрируют, что сурфактантные белки, TLR- и NOD-рецепторы, DC-SIGN, маннозные и скавенджер-рецепторы играют двойную роль при туберкулезе, с одной стороны участвуя в запуске протективного иммунитета и элиминации бацилл, а с другой — способствуя формированию иммуносупрессии. Во многом это зависит от стадии инфекционного процесса и особенностей макроорганизма.

Дальнейшее изучение генетических и эпигенетических основ туберкулеза позволит разработать новые методы диагностики и борьбы с этим заболеванием. Так, обнаружение полиморфизмов, являющихся генетическими биомаркерами, можно использовать для скрининга, для прогнозирования риска инфицирования и оценки риска развития активного туберкулеза у людей, инфицированных *M. tuberculosis*. Значимость паттерн-распознающих рецепторов ограничивается не только их потенциальным использованием в качестве ассоциативных маркеров предрасположенности к туберкулезной инфекции, но и возможной мишени для иммуномодулирующей терапии.

Список литературы/References

1. Герасимов А.Н., Михеева И.В. Эпидемиологическая ситуация с туберкулезом в России – кажущееся благополучие и скрытые угрозы // Тихоокеанский медицинский журнал. 2018. № 3. С. 75–78. [Gerasimov A.N., Mikheeva I.V. The epidemiological situation with tuberculosis in Russia: an apparent well-being and hidden threats. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 3, pp. 75–78. (In Russ.)]
2. Звонкова С.Г., Зоркальцева Е.Ю., Огарков О.Б. Изучение особенностей полиморфизма генов DC-SIGN-336A/G, MCP1-2518A/G, $INF\gamma$ +874A/T и конституциональных типов у детей с туберкулезной инфекцией // Acta Biomedica Scientifica. 2011. Т. 78, № 2. С. 198–200. [Zvonkova S.G., Zorkaltseva E.Yu., Ogarkov O.B. Polymorphism peculiarities of genes DC-SIGN-336A/G, MCP1-2518A/G, $INF\gamma$ +874A/T and constitutional types in children with tuberculosis infection. *Acta Biomedica Scientifica*, 2011, vol. 78, no. 2, pp. 198–200. (In Russ.)]
3. Малышев И.Ю., Лямина С.В., Шимшелашвили Ш.Л., Вассерман Е.Н. Функциональные ответы альвеолярных макрофагов, сурфактантный белок D и заболевания легких // Пульмонология. 2014. № 3. С. 101–107. [Malyshev I.Y., Lyamina S.V., Shimshelashvili S.L., Vasserman E.N. Functions of alveolar macrophages and surfactant protein D in lung disease. *Pul'monologiya = Russian Pulmonology*, 2011, no. 3, pp. 101–107. (In Russ.)]
4. Синьков В.В., Огарков О.Б., Зоркальцева Е.Ю., Скворцова Р.Г., Савилов Е.Д., Воробьева Д.В., Корчина С.И., Жданов С.Н., Косенкова Д.В., Медведева Т.В. Полиморфизм генов DC-SIGN –336A/G, MCP1 –2518A/G, $INF\gamma$ +874A/T у больных легочным туберкулезом в Иркутской области // Сибирский медицинский журнал. 2009. Т. 90, № 7. С. 30–33. [Sinkov V.V., Ogarkov O.B., Zorkaltseva E.Yu., Skvortsova R.G., Savilov E.D., Vorob'eva O.A., Korchina S.I., Zhdanova S.N., Kosenkova D.V., Medvedeva T.V. Polymorphism of DC-SIGN-336A/G, MCP1-2518A/G and $INF\gamma$ + 874A / T genes in patients with pulmonary tuberculosis in Irkutsk region. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Sibirskij Medicinskij Zhurnal*, vol. 90, no. 7, pp. 30–33. (In Russ.)]
5. Astarie-Dequeker C., Le Guyader L., Malaga W., Seaphanh F.-K., Chalut C., Lopez A., Guilhot C. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 2: e1000289. doi: 10.1371/journal.ppat.1000289
6. Astarie-Dequeker C., N'Diaye E.N., Cabec V.Le, Rittig M.G., Prandi J., Maridonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect. Immun.*, 1999, vol. 67, no. 2, pp. 469–477.
7. Azad A.K., Sadee W., Schlesinger L.S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, no. 10, pp. 3343–3359. doi: 10.1128/IAI.00443-12

8. Azad A.K., Torrelles J.B., Schlesinger L.S. Mutation in the DC-SIGN cytoplasmic triacidic cluster motif markedly attenuates receptor activity for phagocytosis and endocytosis of mannose-containing ligands by human myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, vol. 84, no. 6, pp. 1594–1603. doi: 10.1189/jlb.0308192
9. Bandyopadhyay U., Chadha A., Gupta P., Tiwari B., Bhattacharyya K., Popli S., Raman R., Brahamachari V., Singh Y., Malhotra P., Natarajan K. Suppression of Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory responses by Mycobacterium tuberculosis protein Rv3529c. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, vol. 102, no. 5, pp. 1249–1259. doi: 10.1189/jlb.4A0217-042R
10. Bao M., Yi Z., Fu Y. Activation of TLR7 inhibition of Mycobacterium tuberculosis survival by autophagy in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.*, 2017, vol. 118, no. 12, pp. 4222–4229. doi: 10.1002/jcb.26072
11. Barreiro L.B., Neyrolles O., Babb C.L., Tailleux L., Quach H., McElreavey K., Helden P.D. Van, Hoal E.G., Gicquel B., Quintana-Murci L. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med.*, 2006, vol. 3, no. 2: e20. doi: 10.1371/journal.pmed.0030020
12. Beharka A.A., Gaynor C.D., Kang B.K., Voelker D.R., McCormack F.X., Schlesinger L.S. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, no. 7, pp. 3565–3573. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3565
13. Ben-Ali M., Barbouche M.-R., Bousnina S., Chabbou A., Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.*, 2004, vol. 11, no. 3, pp. 625–626. doi: 10.1128/CDLI.11.3.625-626.2004
14. Bharti D., Kumar A., Mahla R.S., Kumar S., Ingle H., Shankar H., Joshi B., Raut A.A., Kumar H. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Immunogenetics*, 2014, vol. 66, no. 12, pp. 675–681. doi: 10.1007/s00251-014-0806-1
15. Boily-Larouche G., Zijenah L.S., Mbizvo M., Ward B.J., Roger M. DC-SIGN and DC-SIGNR genetic diversity among different ethnic populations: Potential implications for pathogen recognition and disease susceptibility. *Hum. Immunol.*, 2007, vol. 68, no. 6, pp. 523–530. doi: 10.1016/j.humimm.2007.02.002
16. Bowdish D.M.E., Sakamoto K., Kim M., Kroos M., Mukhopadhyay S., Leifer C.A., Tryggvason K., Gordon S., Russell D.G. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 6: e1000474. doi: 10.1371/journal.ppat.1000474
17. Brooks M.N., Rajaram M.V.S., Azad A.K., Amer A.O., Valdivia-arenas M.A., Park J., Núñez G., Schlesinger L.S. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG in human macrophages. *Cell. Microbiol.*, 2010, vol. 13, no. 3, pp. 402–418. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01544.x
18. Capparelli R., Iannaccone M., Palumbo D., Medaglia C., Moscariello E., Russo A., Iannelli D. Role played by human mannose-binding lectin polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 199, no. 5, pp. 666–672. doi: 10.1086/596658
19. Ceylan E., Karkucak M., Coban H., Karadag M., Yakut T. Evaluation of TNF-alpha gene (G308A) and MBL2 gene codon 54 polymorphisms in Turkish patients with tuberculosis. *J. Infect. Public Health*, 2017, vol. 10, no. 6, pp. 774–777. doi: 10.1016/j.jiph.2016.11.003
20. Chieppa M., Bianchi G., Doni A., Prete A., Del, Sironi M., Laskarin G., Monti P., Piemonti L., Biondi A., Mantovani A., Introna M., Allavena P. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 9, pp. 4552–4560. doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4552
21. Chroneos Z.C., Midde K., Sever-Chroneos Z., Jagannath C. Pulmonary surfactant and tuberculosis. *Tuberculosis*, 2009, vol. 89, suppl. 1, pp. S10–14. doi: 10.1016/S1472-9792(09)70005-8
22. Chua J., Vergne I., Master S., Deretic V. A tale of two lipids: Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, vol. 7, no. 1, pp. 71–77. doi: 10.1016/j.mib.2003.12.011
23. Coulombe F., Divangahi M., Veyrier F., Léséleuc L. De, Gleason J.L., Yang Y., Kelliher M.A., Pandey A.K., Sasseti C.M., Reed M.B., Behr M.A. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J. Exp. Med.*, 2009, vol. 206, no. 8, pp. 1–8. doi: 10.1084/jem.20081779
24. Court N., Vasseur V., Vacher R., Fremond C., Shebzukhov Y., Yeremeev V.V., Maillet I., Nedospasov S.A., Gordon S., Fallon P.G., Suzuki H., Ryffel B., Quesniaux V.F.J. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, no. 12, pp. 7057–7070. doi: 10.4049/jimmunol.1000164
25. Dalgic N., Tekin D., Kayaalti Z., Soylemezoglu T., Cakir E., Kilic B., Kutlubay B., Sancar M., Odabasi M. Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis. *Hum. Immunol.*, 2011, vol. 72, no. 5, pp. 440–445. doi: 10.1016/j.humimm.2011.02.001
26. De Oliveira L.R., Peresi E., Golim Mde A., Gatto M., Araújo Junior J.P., da Costa É.A., Ayres J.A., Fortes M.R., Calvi S.A. Analysis of Toll-like receptors, iNOS and cytokine profiles in patients with pulmonary tuberculosis during anti-tuberculosis treatment. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2: e88572. doi: 10.1371/journal.pone.0088572
27. DeFife K.M., Jenney C.R., McNally A.K., Colton E., Anderson J.M. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, no. 7, pp. 3385–3390.
28. Dodd C.E., Pyle C.J., Glowinski R., Rajaram M.V.S., Schlesinger L.S. CD36-mediated uptake of surfactant lipids by human macrophages promotes intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.*, 2016, vol. 197, no. 12, pp. 4727–4735. doi: 10.4049/jimmunol.1600856
29. Enomoto Y., Hagiwara E., Komatsu S., Nishihira R., Baba T., Ogura T. Comparison of biomarkers of pulmonary tuberculosis activity — serum surfactant proteins A and D, KL-6, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate. *Kekkaku: [Tuberculosis]*, 2014, vol. 89, no. 7, pp. 637–642.
30. Ferguson J.S., Martin J.L., Azad A.K., McCarthy T.R., Kang P.B., Voelker D.R., Crouch E.C., Schlesinger L.S. Surfactant protein D increases fusion of Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes with lysosomes in human macrophages. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 12, pp. 7005–7009. doi: 10.1128/IAI.01402-06
31. Figdor C.G., Kooyk van Y., Adema G.J. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 2, no. 2, pp. 77–84. doi: 10.1038/nri723

32. Floros J., Lin H., García A., Salazar M.A., Guo X., DiAngelo S., Montañó M., Luo J., Pardo A., Selman M. Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 182, no. 5, pp. 1473–1478. doi: 10.1086/315866
33. Fratti R.A., Chua J., Vergne I., Deretic V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 9, pp. 5437–5442. doi: 10.1073/pnas.0737613100
34. Fremont C.M., Yeremeev V., Nicolle D.M., Jacobs M., Quesniaux V.F., Ryffel B. Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J. Clin. Invest.*, 2004, vol. 114, no. 12, pp. 1790–1799. doi: 10.1172/JCI21027
35. Garred P., Richter C., Andersen Å.B., Madsen H.O., Mtoni I., Svejgaard A., Shao J. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand. J. Immunol.*, 1997, vol. 46, no. 2, pp. 204–208.
36. Geijtenbeek T.B.H., Vliet S.J. van, Koppel E.A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Appelmelk B., Kooyk van Y. Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 197, no. 1, pp. 7–17. doi: 10.1084/jem.20021229
37. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 2010, vol. 327, no. 5966, pp. 656–661. doi: 10.1126/science.1178331
38. Gomez L.M., Anaya J.M., Sierra-Filardi E., Cadena J., Corbi A., Martin J. Analysis of DC-SIGN (CD209) Functional variants in patients with tuberculosis. *Hum. Immunol.*, 2006, vol. 67, no. 10, pp. 808–811. doi: 10.1016/j.humimm.2006.07.003
39. Gupta D., Sharma S., Singhal J., Satsangi A.T., Antony C., Natarajan K. Suppression of TLR2-induced IL-12, reactive oxygen species, and inducible nitric oxide synthase expression by Mycobacterium tuberculosis antigens expressed inside macrophages during the course of infection. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, no. 10, pp. 5444–5455. doi: 10.4049/jimmunol.0903283
40. Guzel A., Karadag A., Okuyucu A., Alacam H., Kucuk Y. The evaluation of serum surfactant protein D (SP-D) levels as a bio-marker of lung injury in tuberculosis and different lung diseases. *Clin. Lab.*, 2014, vol. 60, no. 7, pp. 1091–1098.
41. Harding C.V., Boom W.H. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, no. 4, pp. 296–307. doi: 10.1038/nrmicro2321
42. Harriff M.J., Cansler M.E., Toren K.G., Canfield E.T., Kwak S., Gold M.C., Lewinsohn D.M. Human lung epithelial cells contain Mycobacterium tuberculosis in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8+ T cells. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 5: e97515. doi: 10.1371/journal.pone.0097515
43. Härtel C., Rupp J., Hoegemann A., Bohler A., Spiegler J., Otte S. Von, Röder K., Schultz C., Göpel W. 159C > T CD14 genotype — Functional effects on innate immune responses in term neonates. *Hum. Immunol.*, 2008, pp. 338–343. doi: 10.1016/j.humimm.2008.04.011
44. Hawkes M., Li X., Crockett M., Diassiti A., Finney C., Min-Oo G., Liles W.C., Liu J., Kain K.C. CD36 deficiency attenuates experimental mycobacterial infection. *BMC Infect. Dis.*, 2010, vol. 10: 299. doi: 10.1186/1471-2334-10-299
45. Heldwein K.A., Fenton M.J. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect.*, 2002, vol. 4, no. 9, pp. 937–944. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01611-8
46. Henning L.N., Azad A.K., Parsa K.V.L., Crowther J.E., Tridandapani S., Schlesinger L.S. Pulmonary surfactant protein a regulates TLR expression and activity in human macrophages. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 2, pp. 7847–7858. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.7847
47. Hsieh M.H., Ou C.Y., Hsieh W.Y., Kao H.F., Lee S.W., Wang J., Wu L.S.H. Functional analysis of genetic variations in surfactant protein D in Mycobacterial infection and their association with tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01543
48. Jo E.K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 21, no. 3, pp. 279–286. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f88b5d
49. Jo E.K., Yang C.S., Choi C.H., Harding C.V. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: bzzzranching out from Toll-like receptors. *Cell. Microbiol.*, 2007, vol. 9, no. 5, pp. 1087–1098. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x
50. Kang P.B., Azad A.K., Torrelles J.B., Kaufman T.M., Beharka A., Tibesar E., DesJardin L.E., Schlesinger L.S. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 202, no. 7, pp. 987–999. doi: 10.1084/jem.20051239
51. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, vol. 11, no. 5, pp. 373–384. doi: 10.1038/ni.1863
52. Khan A., Mann L., Papanna R., Lyu M.-A., Singh C.R., Olson S., Eissa N.T., Cirillo J., Das G., Hunter R.L., Jagannath C. Mesenchymal stem cells internalize Mycobacterium tuberculosis through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1. doi: 10.1038/s41598-017-15290-z
53. Khan N., Pahari S., Vidyarthi A., Aqdas M., Agrewala J.N. NOD-2 and TLR4 signaling reinforces the efficacy of dendritic cells and reduces the dose of TB drugs against Mycobacterium tuberculosis. *J. Innate Immun.*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 228–242. doi: 10.1159/000439591
54. Konowich J., Gopalakrishnan A., Dietzold J., Verma S., Bhatt K., Rafi W., Salgame P. Divergent functions of TLR2 on hemato-poietic and nonhematopoietic cells during chronic Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2016, vol. 198, no. 2, pp. 741–748. doi: 10.4049/jimmunol.1601651
55. Kusner D.J. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin. Immunol.*, 2005, vol. 114, no. 3, pp. 239–247. doi: 10.1016/j.clim.2004.07.016
56. Lee J.Y., Hwang E.H., Kim D.J., Oh S.M., Lee K.B., Shin S.J., Park J.H. The role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 during cytokine production by macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunobiology*, 2016, vol. 221, no. 1, pp. 70–75. doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.020
57. Lee M.S., Kim Y.J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, vol. 76, pp. 447–480. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060605.122847
58. Li Y., Wang Y., Liu X. The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, vol. 2012. doi: 10.1155/2012/791392

59. Liu P.T., Stenger S., Li H., Wenzel L., Tan B.H., Krutzik S.R., Ochoa M.T., Schauber J., Wu K., Meinken C., Kamen D.L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zügel U., Gallo R.L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B.W., Adams J.S., Bloom B.R., Modlin R.L. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 2006, vol. 311, no. 5768, pp. 1770–1773. doi: 10.1126/science.1123933
60. Lugo-Villarino G., Hudrisier D., Tanne A., Neyrolles O. C-type lectins with a sweet spot for Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 25–40. doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.6
61. Lugo-Villarino G., Troegeler A., Balboa L., Lastrucci C., Duval C., Mercier I., Bénard A., Capilla F., Saati T. Al, Poincloux R., Kondova I., Verreck F.A.W., Cougoule C., Maridonnew-Parini I., Sasiain M.D.C., Neyrolles O. The C-type lectin receptor DC-SIGN has an anti-inflammatory role in human M(IL-4) macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 1123. doi: 10.3389/fimmu.2018.01123
62. Lv J., He X., Wang H., Wang Z., Kelly G.T., Wang X., Chen Y., Wang T., Qian Z. TLR4-NOX2 axis regulates the phagocytosis and killing of Mycobacterium tuberculosis by macrophages. *BMC Pulm. Med.*, 2017, vol. 17, no. 1, p. 194. doi: 10.1186/s12890-017-0517-0
63. Maes E., Coddeville B., Kremer L., Guérardel Y. Polysaccharide structural variability in mycobacteria: Identification and characterization of phosphorylated mannan and arabinomannan. *Glycoconj. J.*, 2007, vol. 24, no. 8, pp. 439–448. doi: 10.1007/s10719-007-9036-1
64. Malik S., Greenwood C.M.T., Eguale T., Kifle A., Beyene J., Habte A., Tadesse A., Gebrexabher H., Britton S., Schurr E. Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia. *Hum. Genet.*, 2006, vol. 118, no. 6, pp. 752–759. doi: 10.1007/s00439-005-0092-y
65. Martinez-Pomares L., Reid D.M., Brown G.D., Taylor P.R., Stillion R.J., Linehan S.A., Zamze S., Gordon S., Wong S.Y.C. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukocyte Biol.*, 2003, vol. 73, no. 5, pp. 604–613. doi: 10.1189/jlb.0902450
66. Matsushita M., Endo Y., Fujita T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: Its molecular basis and physiological implication. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2013, vol. 61, no. 4, pp. 273–283. doi: 10.1007/s00005-013-0229-y
67. McBride A., Konowich J., Salgame P. Host defense and recruitment of Foxp3+ T regulatory cells to the lungs in chronic mycobacterium tuberculosis infection requires Toll-like receptor 2. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 6: e1003397. doi: 10.1371/journal.ppat.1003397
68. McGreal E.P., Miller J.L., Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005, vol. 17, no. 1, pp. 18–24. doi: 10.1016/j.coi.2004.12.001
69. Mishra A.K., Driessen N.N., Appelmelk B.J., Besra G.S. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in Mycobacterium tuberculosis physiology and host–pathogen interaction. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011, vol. 35, no. 6, pp. 1126–1157
70. Mittal M., Biswas S.K., Singh V., Arela N., Katoch V.M., Das R., Yadav V.S., Bajaj B., Mohanty K.K. Association of Toll like receptor 2 and 9 gene variants with pulmonary tuberculosis: exploration in a northern Indian population. *Mol. Biol. Rep.*, 2018, vol. 45, no. 4, pp. 469–476. doi: 10.1007/s11033-018-4182-z
71. Nair V.R., Franco L.H., Zacharia V.M., Khan H.S., Stamm C.E., You W., Marciano D.K., Yagita H., Levine B., Shiloh M.U. Microfold cells actively translocate Mycobacterium tuberculosis to initiate infection. *Cell Rep.*, 2016, vol. 16, no. 5, pp. 1253–1258. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.080
72. Nigou J., Zelle-Rieser C., Gilleron M., Thurnher M., Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, no. 12, pp. 7477–7485. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7477
73. Pattison M.J., Mitchell O., Flynn H.R., Chen C.-S., Yang H.-T., Ben-Addi H., Boeing S., Sniijders A.P., Ley S.C. TLR and TNF-R1 activation of the MKK3/MKK6-p38 α axis in macrophages is mediated by TPL-2 kinase. *Biochem. J.*, 2016, vol. 473, no. 18, pp. 2845–2861. doi: 10.1042/BCJ20160502
74. Peterson P.K., Gekker G., Hu S., Sheng W.S., Anderson W.R., Ulevitch R.J., Tobias P.S., Gustafson K.V., Molitor T.W., Chao C.C. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63, no. 4, pp. 1598–1602
75. Platz J., Beisswenger C., Dalpke A., Koczulla R., Pinkenburg O., Vogelmeier C., Bals R. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J. Immunol.*, 2004, vol. 173, no. 2, pp. 1219–1223. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1219
76. Prabha C., Rajashree P., Sulochana D.D. TLR2 and TLR4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid. *Immunol. Lett.*, 2008, vol. 117, no. 1, pp. 26–34. doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.002
77. Pöyhönen L., Kröger L., Huhtala H., Mäkinen J., Nuolivirta K., Mertsola J., He Q., Korppi M. Association of MBL2, TLR1, TLR2 and TLR6 polymorphisms with production of IFN- γ and IL-12 in BCG osteitis survivors R1. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2017, vol. 36, no. 2, pp. 135–139. doi: 10.1097/INF.0000000000001375
78. Queiroz A., Riley L.W. Bacterial immunostat: Mycobacterium tuberculosis lipids and their role in the host immune response. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2017, vol. 50, no. 1, pp. 9–18. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2016
79. Quesniaux V., Fremont C., Jacobs M., Parida S., Nicolle D., Yermeev V., Bihl F., Erard F., Botha T., Drennan M., Soler M.N., Le Bert M., Schnyder B., Ryffel B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect.*, 2004, vol. 6, no. 10, pp. 946–959. doi: 10.1016/j.micinf.2004.04.016
80. Ramakrishna K., Premkumar K., Kabeerdoss J., John K.R. Impaired toll like receptor 9 response in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, 2017, vol. 90, pp. 38–43. doi: 10.1016/j.cyto.2016.10.006
81. Richardson E.T., Shukla S., Sweet D.R., Wearsch P.A., Tschlis P.N., Boom W.H., Harding C. V. Toll-like receptor 2-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells. *Infect. Immun.*, 2015, vol. 83, no. 6, pp. 2242–2254. doi: 10.1128/iai.00135-15
82. Rivas-Santiago B., Contreras J.C.L., Sada E., Hernández-Pando R. The potential role of lung epithelial cells and β -defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand. J. Immunol.*, 2008, vol. 67, no. 5, pp. 448–452. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02088.x

83. Rivas-Santiago B., Hernandez-Pando R., Carranza C., Juarez E., Contreras J.L., Aguilar-Leon D., Torres M., Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2008, vol. 76, no. 3, pp. 935–941. doi: 10.1128/IAI.01218-07
84. Rocha-Ramírez L.M., Estrada-García I., López-Marín L.M., Segura-Salinas E., Méndez-Aragón P., Soolingen D. Van, Torres-González R., Chacón-Salinas R., Estrada-Parra S., Maldonado-Bernal C., López-Macías C., Isibasi A. Mycobacterium tuberculosis lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis*, 2008, vol. 88, no. 3, pp. 212–220. doi: 10.1016/J.TUBE.2007.10.003
85. Rothfuchs A.G., Bafica A., Feng C.G., Egen J.G., Williams D.L., Brown G.D., Sher A. Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J. Immunol.*, 2007, vol. 179, no. 6, pp. 3463–3471. doi: 10.4049/jimmunol.179.6.3463
86. Saavedra R., Segura E., Leyva R., Esparza L.A., López-Marín L.M. Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, vol. 8, no. 6, pp. 1081–1088. doi: 10.1128/CDLI.8.6.1-91-1088.2001
87. Sakamoto K., Kim M.J., Rhoades E.R., Allavena R.E., Ehrt S., Wainwright H.C., Russell D.G., Rohde K.H. Mycobacterial trehalose dimycolate reprograms macrophage global gene expression and activates matrix metalloproteinases. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 3, pp. 764–776. doi: 10.1128/IAI.00906-12
88. Schlesinger L.S., Azad A.K., Torrelles J.B., Roberts E. Determinants of phagocytosis, phagosome biogenesis and autophagy for Mycobacterium tuberculosis. In: Handbook of tuberculosis. Immunology and cell biology. Eds: Kaufmann S.H.E., Britton W.J. Wiley-VCH Verlag; Weinheim, Germany: 2008. pp. 1–22.
89. Schlesinger L., Torrelles J., Azad A., Henning L., Carlson T. Role of C-type lectins in Mycobacterial infections. *Curr. Drug Targets*, 2008, vol. 9, no. 2, pp. 102–112. doi: 10.2174/138945008783502467
90. Schurz H., Daya M., Möller M., Hoal E.G., Salie M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 10: e0139711. doi: 10.1371/journal.pone.0139711
91. Selvaraj P., Jawahar M.S., Rajeswari D.N., Alagarasu K., Vidyarani M., Narayanan P.R. Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006, vol. 46, no. 3, pp. 433–437. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00053.x
92. Sepehri Z., Kiani Z., Kohan F., Ghavami S. Toll-like receptor 4 as an immune receptor against Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *Lab. Med.*, 2018. doi: 10.1093/labmed/lmy047
93. Sequeira P.C., Senaratne R.H., Riley L.W. Inhibition of toll-like receptor 2 (TLR-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and Mycobacterium tuberculosis mce1 operon mutant. *Pathog. Dis.*, 2014, vol. 70, no. 2, pp. 132–140. doi: 10.1111/2049-632X.12110
94. Sever-Chroneos Z., Tvinnereim A., Hunter R.L., Chrones Z.C. Prolonged survival of scavenger receptor class A-deficient mice from pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2011, vol. 91, suppl. 1, pp. S69–S74. doi: 10.1016/j.tube.2011.10.014
95. Shin D.M., Yuk J.M., Lee H.M., Lee S.H., Son J.W., Harding C. V., Kim J.M., Modlin R.L., Jo E.K. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell. Microbiol.*, 2010, vol. 12, no. 11, pp. 1648–1665. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01497.x
96. Soeroto A.Y., Dahlan Z., Kartasmita C.B., Parwati I. Association between Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms of TLR2 gene with active pulmonary tuberculosis in an Indonesian population. *Acta Med. Indones.*, 2018, vol. 50, no. 1, pp. 53–60.
97. Sorensen G.L. Surfactant protein D in respiratory and non-respiratory diseases. *Front. Med.*, 2018, vol. 5, no. 18. doi: 10.3389/fmed.2018.00018
98. Srivastava V., Manchanda M., Gupta S., Singla R., Behera D., Das G., Natarajan K. Toll-like receptor 2 and DC-SIGNR1 differentially regulate suppressors of cytokine signaling 1 in dendritic cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 38, pp. 25532–25541. doi: 10.1074/jbc.M109.006221
99. Suzuki T., Chow C., Downey G.P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, vol. 40, no. 6–7, pp. 1348–1361. doi: 10.1016/j.biocel.2008.01.003
100. Søborg C., Madsen H.O., Andersen A.B., Lillebaek T., Kok-Jensen A., Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 188, no. 5, pp. 777–782. doi: 10.1086/377183
101. Tailleux L., Pham-Thi N., Bergeron-Lafaurie A., Herrmann J.L., Charles P., Schwartz O., Scheinmann P., Lagrange P.H., De Blic J., Tazi A., Gicquel B., Neyrolles O. DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med.*, 2005, vol. 2, no. 12, pp. 1269–1279. doi: 10.1371/journal.pmed.0020381
102. Tailleux L., Schwartz O., Herrmann J.-L., Pivert E., Jackson M., Amara A., Legres L., Dreher D., Nicod L.P., Gluckman J.C., Lagrange P.H., Gicquel B., Neyrolles O. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 197, no. 1, pp. 121–127. doi: 10.1084/jem.20021468
103. Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R.L., Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, no. 1, pp. 10–14. doi: 10.4049/jimmunol.169.1.10
104. Torrelles J.B., Azad A.K., Schlesinger L.S. Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from Mycobacterium tuberculosis by C-type lectin pattern recognition receptors. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 3, pp. 1805–1816. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1805
105. Udgata A., Qureshi R., Mukhopadhyay S. Transduction of functionally contrasting signals by two mycobacterial PPE proteins downstream of TLR2 receptors. *J. Immunol.*, 2016, vol. 197, no. 5, pp. 1776–1787. doi: 10.4049/jimmunol.1501816
106. Van der Veerdonk F.L., Teirlinck A.C., Kleinnijenhuis J., Kullberg B.J., van Crevel R., van der Meer J.W.M., Joosten L.A.B., Netea M.G. Mycobacterium tuberculosis induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 88, no. 2, pp. 227–232. doi: 10.1189/jlb.0809550

107. Villeneuve C., Gilleron M., Maridonneau-Parini I., Daffe M., Astarie-Dequeker C., Etienne G. Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *J. Lipid Res.*, 2005, vol. 46, no. 3, pp. 475–483. doi: 10.1194/jlr.M400308-JLR200
108. Wieland C.W., van der Windt G.J.W., Wiersinga W.J., Florquin S., van der Poll T. CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. *Immunology*, 2008, vol. 125, no. 2, pp. 272–279. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02840.x
109. Wright J.R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5, no. 1, pp. 58–68. doi: 10.1038/nri1528
110. Wu S., Huang W., Wang D., Wang Y., Wang M., Zhang M., He J.-Q. Evaluation of TLR 2, TLR 4, and TOLLIP polymorphisms for their role in tuberculosis susceptibility. *Apmis*, 2018, vol. 126, no. 6, pp. 501–508. doi: 10.1111/apm.12855
111. Xu Q., Jin M.M., Zheng W.W., Zhu L., Xu S.L. Role of Toll-like receptor 2/4-nuclear factor- κ B signaling pathway in invasion of Mycobacterium tuberculosis to mouse dendritic cells. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2014, vol. 43, no. 2, pp. 200–206.
112. Xue Y., Zhao Z.Q., Chen F., Zhang L., Li G.D., Ma K.W., Bai X.F., Zuo Y.J. Polymorphisms in the promoter of the CD14 gene and their associations with susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens*, 2012, vol. 80, no. 5, pp. 437–443. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01958.x
113. Yadav M., Schorey J.S. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 9, pp. 3168–3175. doi: 10.1182/blood-2006-05-024406
114. Yang C.-S., Shin D.-M., Kim K.-H., Lee Z.-W., Lee C.-H., Park S.G., Bae Y.S., Jo E.-K. NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 6, pp. 3696–705. doi: 10.4049/jimmunol.0802217
115. Yang Y., Kulka K., Montelaro R.C., Reinhart T.A., Sissons J., Aderem A., Ojha A.K. A hydrolase of trehalose dimycolate induces nutrient influx and stress sensitivity to balance intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Host Microbe*, 2014, vol. 15, no. 2, pp. 153–163. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.008
116. Zenaro E., Donini M., Dusi S. Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, mannose receptor, and DC-SIGN. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, vol. 86, no. 6, pp. 1393–1401. doi: 10.1189/jlb.0409242
117. Zhao L., Liu K., Kong X., Tao Z., Wang Y., Liu Y. Association of polymorphisms in Toll-like receptors 4 and 9 with risk of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Med. Sci. Monit.*, 2015, vol. 21, pp. 1097–1106. doi: 10.12659/MSM.893755
118. Zimmermann N., Saiga H., Houthuys E., Moura-Alves P., Koehler A., Bandermann S., Dorhoi A., Kaufmann S.H.E. Syndecans promote mycobacterial internalization by lung epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 2016, vol. 18, no. 12, pp. 1846–1856. doi: 10.1111/cmi.12627z

Авторы:

Лапштаева А.В., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Живечкова Е.А., ординатор кафедры госпитальной терапии № 2 лечебного факультета ФГАУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

Сычев И.В., аспирант Медицинского института ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Евсегнеева И.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Новиков В.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой молекулярной биологии и иммунологии ФГАУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия; зав. лабораторией иммунохимии ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Lapshtaeva A.V., Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

Zhivchikova E.A., Resident of the Department of Hospital Therapy No. 2, Faculty of Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation;

Sychev I.V., PhD Student, Medical Institute, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

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

Novikov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Molecular Biology and Immunology, N.I. Lobachevskii National Research Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, Russian Federation; Head of the Department of Immunochemisrty, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.03.2019
Отправлена на доработку 22.05.2019
Принята к печати 10.09.2019

Received 22.03.2019
Revision received 22.05.2019
Accepted 10.09.2019

СТРУКТУРА И ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ ГРИППА

В.Н. Зорина

ФГУП ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Активный антигенный дрейф позволяет вирусу гриппа частично или полностью избежать распознавания иммунной системой. Для лечения применяются ингибиторы протон-селективного ионного канала M2 и ингибиторы нейраминидазы, имеющие нежелательные побочные эффекты и провоцирующие появление устойчивых к терапии штаммов вируса. Это обосновывает необходимость поиска новых терапевтических агентов. Лактоферрин (ЛФ) является гликопротеином с молекулярной массой 75–80 kDa, способным связывать ионы металлов. Наибольшие концентрации ЛФ выявляются в молозиве и молоке, значительное количество депонировано в гранулах нейтрофилов. Структура доменов ЛФ молока человека, коровы, козы, свиньи, лошади, верблюда, буйвола гомологична. ЛФ взаимодействует как со специфическими рецепторами, так и с рецепторами эндоцитоза (LRP), Toll-подобными, сигнальными рецепторами на поверхности различных типов клеток. Лактоферрин человека и животных обладает выраженной противовирусной активностью. Данный гликопротеин способен оказывать модулирующее воздействие на иммунную систему, включая гуморальный и клеточный иммунный ответ, регулировать окислительно-восстановительные реакции. Однако литературные данные о роли данного белка в профилактике и лечении гриппа малочисленны. Описана ингибирующая активность ЛФ по отношению к вирусам гриппа А и В, включая штаммы H1N1, H5N1, H7N1, H3N2. Установлено, что ЛФ связывает гемагглютинин вируса, предотвращая взаимодействие с клеткой; блокирует программируемую клеточную смерть, способствующую распространению вируса на поздних стадиях инфекции, через взаимодействие с каспазой 3; блокирует сборку вируса. Пептиды, синтезированные на основе структуры С-домена ЛФ, демонстрируют выраженную ингибирующую активность по отношению к штаммам вируса. Применение ЛФ в качестве адъюванта при вакцинации более эффективно, чем оксида алюминия. Дальнейшее изучение влияния ЛФ на вирус гриппа и иммунный ответ при заражении необходимо для разработки новых методов профилактики и лечения.

Ключевые слова: лактоферрин, пептид, вирусы, грипп, терапия, адъювант.

PATTERN OF LACTOFERRIN ANTI-INFLUENZA VIRUS INHIBITORY ACTIVITY

Zorina V.N.

Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Active antigenic drift allows the influenza virus to partially or completely avoid recognition by the immune system. For treatment, inhibitors of the proton-selective ion channel M2 and inhibitors of neuraminidase are used, which have undesirable side effects and provoke the emergence of treatment-resistant strains of the virus. This justifies

Адрес для переписки:

Зорина Вероника Николаевна
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,
ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА.
Тел.: 8 (812) 499-17-03.
E-mail: nilimmun@yandex.ru

Contacts:

Veronika N. Zorina
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7,
Institute of Highly Pure Biopreparations.
Phone: +7 (812) 499-17-03.
E-mail: nilimmun@yandex.ru

Библиографическое описание:

Зорина В.Н. Структура и ингибирующая активность лактоферрина по отношению к вирусу гриппа // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 49–54. doi: 10.15789/2220-7619-POL-1156

Citation:

Zorina V.N. Pattern of lactoferrin anti-influenza virus inhibitory activity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 49–54. doi: 10.15789/2220-7619-POL-1156

the need to search for new therapeutic agents. Lactoferrin (LF) is a glycoprotein with a molecular mass of 75–80 kDa, capable for binding metal ions. The highest concentrations of LF are detected in colostrum and milk, a significant amount is deposited in neutrophil granules. The structure of the LF domains of human milk, cow, goat, pig, horse, camel, buffalo is homologous. LF interacts with both specific receptors and endocytosis receptors (LRP), Toll-like, signal receptors on the surface of various cell types. Lactoferrin of humans and animals has a high antiviral activity. This glycoprotein modulates the immune system, including the humoral and cellular immune responses, and regulates redox reactions. However, literature data on the role of this protein in the prevention and treatment of influenza are few. LF inhibitory activity against influenza A and B viruses has been described, including H1N1, H5N1, H7N1, H3N2 strains. It has been established that LF binds virus hemagglutinin, preventing interaction with the cell, blocks programmed cell death through interaction with caspase 3 for preventing the spread of the virus at the later stages of the infection, and blocks virus assembly. Peptides synthesized on the basis of LF C-domain structure demonstrate high inhibitory activity against virus. The use of LF as an adjuvant for vaccines is more effective than of aluminum oxide. Further study of LF effects on influenza virus and on the immune response during infection is necessary to develop new methods of prevention and treatment.

Key words: *lactoferrin, peptide, viruses, influenza, therapy, adjuvant.*

Противовирусные свойства молока известны с глубокой древности. Эти свойства связаны с белками молока — казеином, лактальбумином, лактоферрином и другими. В частности, лактоферрин, гликолактин, ангиогенин-1, лактогенин, казеин, лактоферрампин, альфа- и бета-лактальбумины коровьего молока способны, в той или иной степени, подавлять ВИЧ-1 [11]. Сиализированные олигосахариды молока [12] подавляют вирусы гриппа (H1N1, H1N2, H3N2, H9N2). Наиболее выраженной ингибирующей способностью в отношении вирусов обладает лактоферрин (ЛФ). Известно, что лактоферрин подавляет активность штаммов вируса гриппа (H5N1, H1N1, H3N2), вируса полиомиелита, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса человека, энтеровируса, ротавируса, вирусов гепатитов В и С, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типа, ВИЧ-1, вируса Зика, денге и других [3, 4, 5, 6, 11, 16]. Цель данного обзора — обобщение литературных данных по структуре, механизмам действия и активности ЛФ по отношению к вирусу гриппа.

Вакцинация способна эффективно предотвращать эпидемии гриппа, однако не всегда позволяет предотвратить заболевание — активный антигенный дрейф позволяет мутировавшему вирусу частично или полностью избежать распознавания иммунной системой. Для лечения гриппа применяются либо ингибиторы протон-селективного ионного канала М2 (амантадин и его производное римантадин), либо ингибиторы нейраминидазы (NA) (осельтамивир и занамивир). Амантадин и его производные уменьшают продолжительность симптомов, но имеют нежелательные побочные эффекты и провоцируют появление устойчивых к лекарственным средствам штаммов вируса. Ингибиторы NA остаются распространенным средством лечения гриппа, однако имеют ограниченную эффективность при введении на поздней стадии инфекции. Кроме того, сохраняется риск по-

явления устойчивых вирусных штаммов. Это обосновывает необходимость поиска новых терапевтических агентов [3].

Лактоферрин считается продуктом дивергенции гена древнего предшественника трансферрина [9]. Данный белок является гликопротеином; степень гликозилированности у млекопитающих может различаться: у ЛФ человека 3 сайта гликозилирования, у ЛФ коровы их пять [4]. Молекулярная масса белка определяется в пределах 75–80 kDa (689–700 аминокислот) [1, 4, 9, 20]. Различия в молекулярной массе связаны с существованием двух функциональных форм ЛФ: нативной апо-формы (75–77 kDa) и связанной с ионами металлов холо-формы (80–82 kDa). Кроме того, существуют изоформы ЛФ, различающиеся свойствами. Например ЛФ-β и ЛФ-γ обладают РНКазной активностью, ЛФ-α ею не обладает [9]. Аминокислотный состав сообщает ЛФ выраженные щелочные свойства — его изоэлектрическая точка достигает 8–9.

Лактоферрин способен связывать ионы различных металлов [8]. Активнее всего ЛФ взаимодействует с двух- и трехвалентным железом: при лактации до 30% железа молока связано с ЛФ. Однако в крови циркулирует преимущественно апо-форма, с металлами связано не более 6–8% белка. Помимо железа ЛФ связывает ионы меди, цинка, магния, кобальта, алюминия, предположительно взаимодействует с галлием и ванадием [9], но свойства таких молекул и концентрация их в организме остаются малоизученными. Данный белок способен взаимодействовать не только с металлами, но и с гепарином, липополисахаридами, гликозаминогликанами, ДНК [20].

Молекула ЛФ состоит из двух, сходных по молекулярной массе, свернутых в глобулы доменов — N-домена (аминокислотные остатки 1–333) и C-домена (аминокислотные остатки 345–676), соединенных участком (остатки 334–344), формирующим подвижную трех-

витковую α -спираль [4]. Каждый домен, в свою очередь, содержит по два субдомена N1-N2 и C1-C2 [3, 4, 17]. Трехмерные структуры доменов ЛФ человека, коровы, козы, свиньи, лошади, верблюда, буйвола имеют значительную степень гомологии аминокислотных последовательностей (от 72 до 96% у С-домена), но конформационно различаются. Последовательности С и N доменов идентичны на 30–37% [9, 17]. Сайты связывания металлов в субъединицах имеют сходный состав (Asp-60, Tyr-92, Tyr-192 и His-25 в N-субъединице и Asp-395, Tyr-433, Tyr-526, His-595 в С-субъединице, взаимодействующие с анионами CO_3^{2-}) [4].

Рецепторы к ЛФ обнаруживаются на поверхности многих клеток, включая моноциты/макрофаги и нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки [9, 20]. Установлено, что ЛФ способен взаимодействовать не только со специфическими рецепторами ЛФр [20], но и с универсальными LRP рецепторами (low-density lipoprotein receptor-related protein-1 и -2). Известно, что LRP-рецепторы задействованы как в эндоцитозе, так и в проведении сигнала в клетки [1, 2], когда происходит только поверхностный контакт, со смещением трансмембранного участка рецептора вглубь, взаимодействием с белком-адаптером и запуском каскада внутриклеточных реакций. Описано взаимодействие ЛФ с Toll-подобными рецепторами (TLR) [15], а также с лектиновыми и маннозными рецепторами [2].

Наибольшие концентрации ЛФ определяются в молозиве (5–7 мг/мл) и молоке (1–3 мг/мл), однако данный белок также присутствует в крови (около 1 мкг/мл у здоровых и до 5–6 мкг/мл при воспалении), слезной жидкости, слюне, бронхолегочном лаваже, семенной плазме, вагинальных секретах, синовиальной жидкости, спинномозговой жидкости [1, 4, 9, 20]. Лактоферрин в организме происходит преимущественно из двух источников — синтезируется эпителиальными клетками, а также в значительном количестве депонирован в гранулах нейтрофилов [8]. По аминокислотному составу ЛФ, экскретируемый эпителиальными клетками и высвобождаемый при дегрануляции нейтрофилов, идентичен на 97–99%, описаны минорные различия в гликозилировании [9, 10].

При воспалительной реакции ЛФ активно высвобождается из нейтрофилов и его концентрация в крови увеличивается в несколько раз. При септическом состоянии уровень ЛФ может повышаться до 100 раз [27]. Концентрация ЛФ в крови также повышается при нейродегенеративных заболеваниях, аллергической реакции и беременности [9, 20].

Механизмы воздействия ЛФ на вирусы достаточно разнообразны.

1. *Модулирование системы оксидантов/антиоксидантов.* Лактоферрин обладает свойствами антиоксиданта, модулирует реакции кислородного взрыва и окислительного стресса [8, 9]. Известно, что железо играет значительную роль в продукции активных форм кислорода и гидроксильных радикалов. Связывание железа молекулами ЛФ предотвращает перекисное окисление липидов и повреждение супероксидными радикалами ДНК и РНК в митохондриях [2].

2. *Модулирование иммунного ответа.* Лактоферрин является медиатором взаимодействий врожденного и адаптивного иммунного ответа. Лактоферрин повышает активность НК-клеток, фагоцитарную активность нейтрофилов [2, 8, 20]. Данный белок оказывает выраженное и разнообразное воздействие на макрофаги и клетки Лангерганса — в том числе опосредованно, через влияние на цитокиновый профиль (активирует клетки, способствует созреванию, влияет на миграцию). Лактоферрин способствует созреванию Т- и В-лимфоцитов, влияет на соотношение Th1/Th2 клеток [8, 24]. Данный белок модулирует синтез цитокинов — может оказывать и стимулирующее, и ингибирующее воздействие, в том числе на секрецию IFN γ , что особенно важно при вирусной инфекции [2, 20, 24]. Обладает свойствами хемоаттрактанта [27], конкурирует с IL-8 за сайты связывания протеогликанов [2]. Лактоферрин стимулирует экспрессию CD40, модулирует экспрессию CD80, CD86. [24]. Пероральное применение ЛФ стимулирует повышение концентрации IgG и IgA в секретах [2, 20]. ЛФ может ингибировать экспрессию ICAM-1 и влиять на NF- κ B [20]. Данный белок способен воздействовать на компоненты системы комплемента. Продемонстрирована активация экспрессии рецептора C3 компонента комплемента при применении ЛФ [20]. Молекулы ЛФ могут напрямую взаимодействовать с ДНК [9]. Продемонстрировано проникновение ЛФ в ядро клетки, с последующей стимуляцией синтеза IL-6 [15]. Гликаны лактоферрина взаимодействуют с сигнальными рецепторами (маннозный рецептор и другие) [2].

3. *Прямое взаимодействие с вирусом.* ЛФ может связываться с гемагглютинином вирусов, препятствуя взаимодействию с клетками [3, 16]. Кроме того, ЛФ блокирует апоптоз клеток [2]. Известно, что вирусы модулируют апоптоз клеток хозяина, преимущественно используя различные способы его ингибирования. Однако на поздней стадии инфекции, в целях распространения, вирусы напротив, активируют апоптоз. Продемонстрировано, что заражение вирусами гриппа типа А и В приводит к индукции апоптоза как в перmissive, так и в non-permissive культивируемых клетках, а также *in vivo*. Установлено, что активация каспа-

зы-3, стимулирующей развитие апоптоза, является критическим событием для эффективного размножения вируса гриппа, в присутствии ингибиторов каспазы-3 распространение вируса замедляется. Обработка клеток ЛФ ингибирует активность каспазы-3, предотвращая развитие апоптоза и распространение инфекции [13].

4. *Адьювантный эффект.* Лактоферрин может использоваться в качестве адьюванта при вакцинации, поскольку стимулирует антигенпрезентирующие клетки. Продемонстрировано, что лактоферрин, в том числе рекомбинантный, является не только хорошим адьювантом при применении БЦЖ-вакцины, но и оказывает дополнительное благотворное воздействие на бронхолегочную систему [2].

Известно, что ЛФ активен и против ДНК-, и против РНК-вирусов [20]. Однако работ, посвященных влиянию ЛФ, его фрагментов или пептидов на вирус гриппа, крайне мало. В частности, в 1993 г. была опубликована работа, продемонстрировавшая ингибирующую активность ЛФ по отношению к вирусам гриппа А (H3N2) и В, как за счет наличия сиализированных компонентов, препятствующих агглютинации, так и по независимому механизму [7]. Установлено, что пероральное применение ЛФ препятствует развитию пневмонии в эксперименте с вирусом гриппа на мышах [19, 26]. Продемонстрировано, что при заражении вирусом гриппа А, ЛФ блокирует программируемую клеточную смерть через взаимодействие с каспазой-3 [3, 4], а также эффективно блокирует экспорт вирусных рибонуклеопротеинов, предотвращая сборку вируса [13]. Показана блокирующая активность ЛФ по отношению к H5N1 [3, 4, 22], а также к H1N1, H3N2 и H7N1 в эксперименте на культуре клеток, причем эффект обусловлен взаимодействием С-домена с гемагглютинином вируса [3]. Выявлено, что добавление ЛФ в культуры после адсорбции также снижает цитотоксическое воздействие вируса гриппа на клетки, даже при удалении сиаловых кислот из структуры ЛФ [14]. Установлено, что ингибирующей активностью по отношению к вирусу гриппа обладают и десиализированные, и дегликозилированные, и не связанные с железом формы ЛФ [16]. Защитные свойства ЛФ против вирусов, включая вирус гриппа, могут реализовываться за счет усиления экспрессии TLR-7 на дендритных клетках [23]. Лактоферрин способен предотвращать связывание РНК-содержащих вирусов (например, вируса денге) с клеточной мембраной [6].

Необходимо отметить, что молекулы ЛФ очень устойчивы к воздействию трипсином и другими ферментами [9]. В то же время фрагменты ЛФ сохраняют активность по отношению к бактериальным и вирусным агентам.

Отдельного внимания заслуживают пептиды с противовирусной активностью, разработанные на основе структуры ЛФ [3]. При этом наиболее многообещающей точкой приложения подобных пептидов представляются домены гемагглютинаина, поскольку он не только играет ключевую роль в инвазии, но и имеет эволюционно-консервативный эпитоп [3].

Гемагглютинин (HA) является основным гликопротеиновым компонентом вирусной оболочки наряду с нейраминидазой (NA). Это грибовидный тримерный белок, каждый мономер состоит из двух субъединиц: HA1 и HA2. Шаровая «головка» HA, состоящая из цепи HA1, содержит сайты связывания сиаловой кислоты, в то время как консервативная область «стебля» запускает конформационную перестройку при кислом pH, необходимом для возникновения инфекции [16].

Лактоферрин способен связывать HA вируса гриппа А, ингибируя гемагглютинацию и заражение H1N1 и H3N2. Было показано, что фрагмент С-домена ЛФ связывает область, образованную доменом HA2, вместе с несколькими важными остатками в N- и С-концевых сегментах HA1, содержащую универсальный консервативный эпитоп HA [16].

В серии экспериментов выявлено три участка С-домена ЛФ, эффективно взаимодействующих с гемагглютинином вируса гриппа: SKHSSLDCVLRP(418–429), TNGESTADWAKN, (552–563) и AGDDQGLDKCVPNSKEK (506–522). N-субъединица белка противовирусными свойствами не обладала [3]. В соответствии с расшифрованными последовательностями были синтезированы пептиды (в одном случае произведены минорные изменения, с исключением и заменой остатков треонина для повышения стабильности — NGESSADWAKN). Продемонстрирована ингибирующая активность синтезированных пептидов по отношению к H5N1, H7N1, H1N1, H3N2. Синтезированные пептиды подавляли репликацию вируса гриппа значительно активнее (в фемто- и пикомолярных количествах), чем целая молекула ЛФ. При этом ингибирующая активность отмечена и по отношению к резистентному к осельтамивиру штамму H1N1. Авторы предполагают, что подобные пептиды препятствуют взаимодействию между HA1 и HA2 и связыванию HA с рецепторами сиаловой кислоты [3].

Дальнейшие эксперименты с пептидами продемонстрировали ингибирующую активность по отношению к HA еще трех последовательностей, включая KANEGLTWNLSLKDК (441–454), TNGESTADWAKN (552–563), KSETKN (633–638), в эксперименте с двумя штаммами H1N1 и одним штаммом H3N2, однако их активность

была ниже (наномолярные дозы). При оптимизации структуры наиболее эффективного пептида получена последовательность SLDCVLRP, обладающая сходной эффективностью при связывании НА. Короткий пептид SLDC был высокоэффективен только против штамма вируса A/Roma-ISS/02/08 H1N1 [16].

При оценке способности влиять на репликацию вируса в клеточной линии MDCK, наибольшую эффективность продемонстрировали короткие пептиды SLDCVLRP и VLRP по отношению к штаммам H1N1, SLDC и SKHS по отношению к штамму H3N2 [16].

Помимо ЛФ молока, получаемого преимущественно из молока коров, реже коз и верблюдиц, а также синтетических пептидов, проводятся эксперименты по получению трансгенного ЛФ человека от животных [25], рекомбинантного ЛФ [21], генно-инженерных форм ЛФ из риса и других растений [28]. Таблетированные и лиофильные формы белка интенсивно тестируются в качестве перспективных лекарственных средств против бактериальной, грибковой, вирусной инфекции, а также для лечения онкопатологии.

Многие современные вакцины содержат адьюванты, преимущественно гель оксида алюминия. Он провоцирует развитие местной воспалительной реакции, имеет нежелательные побочные эффекты (в частности, подавляет синтез IL-12), при вакцинации новорожденных его следует применять с осторожностью.

Известно, что во многом эффект алюминия основан на активации нейтрофилов. Замена оксида алюминия на ЛФ в качестве адьюванта позволяет получить сходный по выраженности иммунный ответ без негативных эффектов, связанных с применением алюминия. Это позволяет рассматривать ЛФ или пептиды на его основе в качестве перспективного биосовместимого адьюванта при разработке вакцин против гриппа [18].

Таким образом, механизмы блокирования лактоферрином активности вируса гриппа многообразны и заключаются в предотвращении связывания штаммов вируса с поверхностью клеток-мишеней, модулировании интенсивности и направленности иммунного ответа, контроле за развитием кислородного взрыва. Данный белок можно рассматривать в качестве перспективного адьюванта при вакцинопрофилактике. Пептиды, сконструированные на основе анализа молекулы ЛФ, перспективны при профилактике и лечении заболевания в отношении штаммов вирусов, резистентных к общепринятой терапии. При этом пептиды не способны спровоцировать аутоантителогенез, снижающий эффективность нативных гетерологичных молекул ЛФ. Тем не менее, большая часть сведений о противовирусной активности ЛФ получена *in vitro* или в эксперименте, поэтому дальнейшее изучение свойств данного уникального белка представляет большой интерес при разработке противовирусных средств.

Список литературы/References

1. Зорина В.Н., Зорин Н.А. Белковые компоненты врожденного иммунитета в защите от патогенной инвазии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2013. № 3. С. 111–117. [Zorina V.N., Zorin N.A. Protein components of innate immunity in protection from pathogenic invasion. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 3, pp. 111–117 (In Russ.)]
2. Actor J.K., Hwang S.A., Kruzel M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, vol. 15, no. 17, pp. 1956–1973.
3. Ammendolia M.G., Agamennone M., Pietrantonio A., Lannutti F., Siciliano R.A., De Giulio B., Amici C., Superti F. Bovine lactoferrin-derived peptides as novel broad-spectrum inhibitors of influenza virus. *Pathog. Glob. Health.*, 2012, vol. 106, no. 1, pp. 12–19. doi: 10.1179/2047773212Y.0000000004
4. Berlutti F., Pantanella F., Natalizi T., Frioni A., Paesano R., Polimeni A., Valenti P. Antiviral properties of lactoferrin — a natural immunity molecule. *Molecules*, 2011, vol. 16, no. 8, pp. 6992–7018. doi: 10.3390/molecules16086992
5. Carvalho C.A.M., Casseb S.M.M., Gonçalves R.B., Silva E.V.P., Gomes A.M.O., Vasconcelos P.F.C. Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika viruses. *J. Gen. Virol.*, 2017, vol. 98, no. 7, pp. 1749–1754. doi: 10.1099/jgv.0.000849
6. Chen J.M., Fan Y.C., Lin J.W., Chen Y.Y., Hsu W.L., Chiou S.S. Bovine lactoferrin inhibits dengue virus infectivity by interacting with heparan sulfate, low-density lipoprotein receptor, and DC-SIGN. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 9: E1957. doi: 10.3390/ijms18091957
7. Kawasaki Y., Isoda H., Shinmoto H., Tanimoto M., Dosako S., Idota T., Nakajima I. Inhibition by kappa-casein glycomacropptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 1993, vol. 57, no. 7, pp. 1214–1215.
8. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, vol. 62, no. 22, pp. 2549–2559. doi: 10.1007/s00018-005-5370-2
9. Levay P.F., Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 1995, vol. 80, pp. 252–267.
10. Moguilevsky N., Retegui L.A., Masson P.L. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.*, 1985, vol. 229, pp. 353–359. doi: 10.1042/bj2290353
11. Ng T.B., Cheung R.C., Wong J.H., Wang Y., Ip D.T., Wan D.C., Xia J. Antiviral activities of whey proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 99, no. 17, pp. 6997–7008. doi: 10.1007/s00253-015-6818-4

12. Pandey R.P., Kim D.H., Woo J., Song J., Jang S.H., Kim J.B., Cheong K.M., Oh J.S., Sohng J.K. Broad-spectrum neutralization of avian influenza viruses by sialylated human milk oligosaccharides: in vivo assessment of 3'-sialyllactose against H9N2 in chickens. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 2563. doi: 10.1038/s41598-018-20955-4
13. Pietrantoni A., Dofrelli E., Tinari A., Ammendolia M.G., Puzelli S., Fabiani C., Donatelli I., Superti F. Bovine lactoferrin inhibits influenza A virus induced programmed cell death in vitro. *Biometals*, 2010, vol. 23, no. 3, pp. 465–475. doi: 10.1007/s10534-010-9323-3
14. Pietrantoni A., Ammendolia M.G., Superti F. Bovine lactoferrin: involvement of metal saturation and carbohydrates in the inhibition of influenza virus infection. *Biochem. Cell Biol.*, 2012, vol. 90, no. 3, pp. 442–448. doi: 10.1139/o11-072
15. Puddu P., Latorre D., Carollo M., Catizone A., Ricci G., Valenti P., Gessani S. Bovine lactoferrin counteracts Toll-like receptor mediated activation signals in antigen presenting cells. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 7: e22504. doi: 10.1371/journal.pone.0022504
16. Scala M.C., Sala M., Pietrantoni A., Spensiero A., Di Micco S., Agamennone M., Bertamino A., Novellino E., Bifulco G., Gomez-Monterrey I.M., Superti F., Campiglia P. Lactoferrin-derived peptides active towards influenza: identification of three potent tetrapeptide inhibitors. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 10593. doi: 10.1038/s41598-017-10492-x
17. Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochem. Res. Int.*, 2013, vol. 2013, 8 p. doi: 10.1155/2013/271641
18. Sherman M.P., Pritzl C.J., Xia C., Miller M.M., Zaghouni H., Hahm B. Lactoferrin acts as an adjuvant during influenza vaccination of neonatal mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, vol. 467, no. 4, pp. 766–770. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.067
19. Shin K., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Tamura Y., Kurokawa M., Shiraki K. Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *J. Med. Microbiol.*, 2005, vol. 54, pt. 8, pp. 717–723. doi: 10.1099/jmm.0.46018-0
20. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F., García-Montoya I.A., Salazar-Martínez J., Rascón-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2014, vol. 35, no. 5, pp. 557–566. doi: 10.1038/aps.2013.200
21. Spadaro M., Montone M., Arigoni M., Cantarella D., Forni G., Pericle F., Pascolo S., Calogero R.A., Cavallo F. Recombinant human lactoferrin induces human and mouse dendritic cell maturation via Toll-like receptors 2 and 4. *FASEB J.*, 2014, vol. 28, no. 1, pp. 416–429. doi: 10.1096/fj.13-229591
22. Taha S.H., Mehrez M.A., Sitohy M.Z., Abou Dawood A.G., Abd-El Hamid M.M., Kilany W.H. Effectiveness of esterified whey proteins fractions against Egyptian Lethal Avian Influenza A (H5N1). *Virology*, 2010, vol. 7: 330. doi: 10.1186/1743-422X-7-330
23. Van Splunter M., Perdijk O., Fick-Brinkhof H., Feitsma A.L., Floris-Vollenbroek E.G., Meijer B., Brugman S., Savelkoul H.F.J., van Hoffen E., van Neerven R.J.J. Bovine lactoferrin enhances TLR7-mediated responses in plasmacytoid dendritic cells in elderly women: results from a nutritional intervention study with bovine lactoferrin, GOS and vitamin D. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2677. doi: 10.3389/fimmu.2018.02677
24. Wakabayashi H., Oda H., Yamauchi K., Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J. Infect. Chemother.*, 2014, vol. 20, pp. 666–671. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.003
25. Wang M., Sun Z., Yu T., Ding F., Li L., Wang X., Fu M., Wang H., Huang J., Li N., Dai Y. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 10733. doi: 10.1038/s41598-017-11462-z
26. Yamauchi K., Wakabayashi H., Shin K., Takase M. Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. *Biochem. Cell Biol.*, 2006, vol. 84, no. 3, pp. 291–296. doi: 10.1139/o06-054
27. Yang D., de la Rosa G., Tewary P., Oppenheim J.J. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.*, 2009, vol. 30, no. 11, pp. 531–537. doi: 10.1016/j.it.2009.07.004
28. Yemets A.I., Tanasienko I.V., Krasnylenko Y.A., Blume Y.B. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.*, 2014, vol. 38, pp. 989–1002. doi: 10.1002/cbin.10304

Автор:

Зорина В.Н., д.б.н., зам. директора по научной работе ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Author:

Zorina V.N., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Science, Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.02.2019
Отправлена на доработку 21.05.2019
Принята к печати 05.06.2019

Received 28.02.2019
Revision received 21.05.2019
Accepted 05.06.2019

ВЛИЯНИЕ Fc-ФРАГМЕНТОВ НОРМАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА G НА РАЗВИТИЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ШТАММАМИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*, СВЯЗЫВАЮЩИМИ РАЗНЫЕ КЛАССЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Л.А. Бурова, П.В. Пигаревский, В.А. Снегова, Артем А. Тотолян

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Постстрептококковый гломерулонефрит, одно из серьезных осложнений острой инфекции, вызванной стрептококками группы А (СГА), остается до настоящего времени в поле зрения клиницистов и исследователей. Ранее мы показали, что клинические (вирулентные) штаммы СГА с документированной нефритогенной активностью были способны связывать Fc-фрагмент мономерных или агрегированных IgG человека и ряда млекопитающих. Кроме того, в экспериментах на кроликах были получены доказательства ведущей роли стрептококковых IgG Fc-связывающих белков в инициации постстрептококкового гломерулонефрита, сходного по иммуноморфологическим проявлениям с заболеванием у человека. Известна также способность нормального IgG и его Fc-фрагментов подавлять развитие экспериментального гломерулонефрита. Целью настоящего исследования являлось изучение блокирующей способности препарата очищенных Fc-фрагментов нормального IgG кролика на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *S. pyogenes* генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60*, связывающими, соответственно, различные формы иммуноглобулинов: мономерный IgG, иммунные комплексы и IgA. **Материалы и методы.** Для введения кроликам были использованы штаммы СГА генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60*, инициирующие развитие гломерулонефрита и IgA-нефропатии. Fc-фрагменты были получены путем ферментативного переваривания нормального IgG кролика с последующей очисткой на колонке с Sepharose FF, конъюгированной с протеином G. Для оценки иммуноморфологических изменений в почечной ткани кролика применяли морфометрический анализ. **Результаты.** Были выявлены разные по интенсивности и локализации патологические изменения в почечной ткани подопытных животных. Для стрептококков генотипов *emm1* и *emm12* был характерен постстрептококковый гломерулонефрит, первично проявляющийся отложением IgG или IgG–анти-IgG иммунных комплексов в базальной мембране клубочков. Морфологические изменения оценивались как мембранозно-пролиферативный процесс. Между тем, для IgA-гломерулонефрита были свойственны отложения IgA в мезангиальных клетках клубочков, ведущие к мезангиально-пролиферативному процессу. Внутривенное введение препарата Fc-фрагментов нормального IgG кролика по-разному влияло на патологические изменения: 1) Fc-фрагменты IgG полностью подавляли развитие процесса, индуцированного штаммом генотипа *emm1*; 2) частично подавляли измене-

Адрес для переписки:

Тотолян Артем Акович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-68-74.
E-mail: totolian@hotmail.com

Contacts:

Artem A. Totolian
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad. Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-68-74.
E-mail: totolian@hotmail.com

Библиографическое описание:

Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян Артем А. Влияние Fc-фрагментов нормального иммуноглобулина G на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *Streptococcus pyogenes*, связывающими разные классы иммуноглобулинов // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 55–63. doi: 10.15789/2220-7619-IOI-1226

Citation:

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A. Impact of IgG Fc-fragments on experimental glomerulonephritis induced by *Streptococcus pyogenes* strain binding various immunoglobulin classes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 55–63. doi: 10.15789/2220-7619-IOI-1226

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №14-04-00390.

ния, вызванные штаммом генотипа *emm12* и 3) не влияли на процесс, вызванный штаммом генотипа *emm60*. **Заключение.** Приведенные данные указывают на существование различий в механизмах поражения почечных гломерул с участием различных IgFc-рецепторных белков стрептококков группы А. Представляют интерес дальнейшие исследования возможного профилактического или лечебного воздействия Fc-фрагмента IgG на процессы иммунокомплексной природы, осложняющие стрептококковые заболевания.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, Fc-фрагмент IgG, экспериментальный стрептококковый гломерулонефрит, IgG-связывающая активность стрептококка, IgA-связывающая активность стрептококка.

IMPACT OF IgG Fc-FRAGMENTS ON EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS INDUCED BY STREPTOCOCCUS PYOGENES STRAIN BINDING VARIOUS IMMUNOGLOBULIN CLASSES

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis (PSGN), a major complication of acute infections caused by group A streptococci (GAS) remains unclear. Several theories, based on the role of certain streptococcal virulence factors, as well as immunological mimicry between GAS and renal tissue, have been proposed. Earlier, we reported that many virulent clinical GAS isolates showing confirmed nephritogenic activity were capable of non-immune Fc binding of monomeric or aggregated IgG. Moreover, a rabbit model of PSGN allowed to obtain findings regarding a crucial role of streptococcal IgG Fc binding proteins belonging to the M family surface proteins, in the onset of PSGN. Rabbits injected with inactivated IgGFcBP-positive streptococci, acquired changes in the renal tissue with deposited IgG and complement C3, as well as signs of immune inflammation characteristic for human PSGN. Also, it was shown that the induction of experimental glomerulonephritis could be inhibited after normal IgG or its purified Fc fragments were inoculated at early stages of the process. The data obtained in rabbits injected with group A streptococcal type M60 also showed pathogenic functions of the IgA Fc-binding proteins of GAS. The aim of the study was to examine inhibiting activity of the purified rabbit IgG Fc fragments on the manifestations of glomerulonephritis induced by *S. pyogenes* strains capable of binding diverse forms of immunoglobulins such native IgG, immune complexes, and IgA. **Materials and methods.** GAS strains of *emm1*, *emm12* and *emm60* genotypes were used to induce PSGN or IgA-nephropathy in rabbits. Fc fragments derived from rabbit IgG were obtained by enzymatic digestion and purified by affinity chromatography on a protein G-sepharose FF column. Immunomorphological changes of renal tissue were estimated by morphometric analysis. **Results.** In the present study, using the rabbit model, we revealed pathological changes of different intensity and localization in the renal tissue. For streptococci of the *emm1* and *emm12* genotypes, PSGN was characterized by deposition of IgG or IgG-anti-IgG immune complexes within the basal glomerular membrane. Morphological changes were evaluated as a membranous-proliferative glomerulonephritis. Meanwhile, IgA-glomerulonephritis is characterized by deposition of IgA in mesangial cells of glomeruli, leading to the mesangial-proliferative glomerulonephritis or IgA-nephropathy. Intravenously administered purified Fc fragments derived from normal rabbit IgG varied in effects on pathological processes: (i) IgG Fc fragments of fully inhibited development of the PSGN induced by IgG Fc binding strain of *emm1* genotype, (ii) IgG Fc fragments of partially reverted changes caused by the *emm12* genotype strain, which was binding only to immune complexes, and (iii) had no effects on pathological changes caused by the *emm60* genotype GAS strain, which was binding only IgA. **Conclusion.** The data obtained point and emergence of differences in mechanisms of renal lesions development at glomerulonephritis, depending on the *emm* genotype of GAS strain. In addition, it also confirmed GAS-derived involvement for various IgFc-receptor proteins in the pathology. Further studies on potential prophylactic or curative effects of IgG Fc fragments in PSGN should therefore be of interest. The findings might suggest a new therapeutic approach for non-suppurative poststreptococcal diseases.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, IgG Fc fragment, experimental streptococcal glomerulonephritis, IgG binding by streptococcal cells, IgA binding by streptococcal cells.

Введение

Неспецифическое взаимодействие Fc-фрагментов иммуноглобулинов G с Fc-рецепторными структурами (FcR) тканей млекопитающих широко распространено в живых системах и выполняет в них функционально значимые роли. Для возбудителей инфекций это один из факторов агрессии, помогающий микробу избежать влияния иммунной системы макроорга-

низма, выживать и размножаться в нем [26, 27]. В то же время для организма-хозяина оно служит ключевым фактором поддержания баланса его иммунной системы [7, 15, 17]. Взаимодействие Fc рецепторов возбудителя с Fc частью иммуноглобулинов в определенных условиях, каковыми являются энзиматическое расщепление иммуноглобулинов [30], формирование аутоантигена или иммунных комплексов [1, 4, 9], в инфицированном организме может привести к разви-

тию реакция воспаления. Утилизация иммунных комплексов посредством разных тканевых FcR [16, 25, 29] сопряжена с воспалением, приводящим к повреждению ткани. *Streptococcus pyogenes* относится к инфекционным агентам, обладающим FcR-активностью, что сочетается с его ревматогенностью или нефритогенностью [21]. В развитии патологического процесса нельзя отрицать и присутствие различных FcR в тканях сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем [13].

В предыдущих работах по механизмам пост-стрептококкового гломерулонефрита (PSGN) нам удалось создать экспериментальную модель патологии почечных клубочков. В качестве индуцирующих факторов были использованы IgG Fc-позитивные штаммы *S. pyogenes emm1*, 4, 22 генотипов либо M-белки, Emm и Mpr генотипа *emm22*, ответственные за Fc-связывание IgG [4, 9]. При этом были определены морфометрические, иммунологические и иммуногистохимические параметры мембранозно-пролиферативного поражения клубочков. Вслед за зарубежными специалистами [14], нами была установлена способность Fc-фрагментов (но не Fab-фрагментов) нормального IgG человека или кролика подавлять иммунное воспаление и последующее морфологическое повреждение в структурах почечных клубочков. Блокирующий эффект препарата Fc-фрагментов нормального IgG может быть объяснен их способностью либо блокировать активность стрептококковых FcR, либо подавлять взаимодействие тканевых FcR с образующимися в организме иммунными комплексами IgG–anti-IgG.

Позже нами были разработаны модели гломерулонефрита посредством иммунизации кроликов *S. pyogenes* генотипов *emm12* [1, 10] и *emm60* [3], связывающих иммунные комплексы и IgA соответственно. В первом случае процесс также развивался преимущественно по типу PSGN, а во втором — соответствовал IgA-нефропатии (IgAN) по выраженному отложению IgA в мезангиальных клетках клубочков.

В настоящей работе приводятся данные по сравнению блокирующей способности препарата Fc-фрагментов нормального IgG кролика на проявления гломерулонефрита, индуцированные штаммами *S. pyogenes*, неиммунно связывающими разные формы иммуноглобулинов: нативный IgG, иммунные комплексы и IgA.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали стрептококки группы А (СГА) *emm1*, *emm12* и *emm60* генотипов (штаммы M1(40/58),

M12(1800) и M60(3/71), полученные из стрептококковой референс-лаборатории ВОЗ (Прага, Чешская Республика).

Получение очищенных препаратов Fc-фрагментов IgG кролика. Fc-фрагменты нормального IgG кролика были получены путем его переваривания активированным папаином фирмы Merck. Для получения очищенных Fc-фрагментов была применена аффинная хроматография на колонке Sepharose FF, конъюгированной с протеином G (GE Healthcare), и гель-фильтрация на колонке с Superdex 75. Чистоту препаратов контролировали в реакции иммунной преципитации, используя набор соответствующих иммунных сывороток против Fc-, Fab-фрагментов IgG кролика, а также против кроличьих иммуноглобулинов других классов.

IgA для получения анти-IgA антител был выделен из сыворотки больного IgA-миеломой, любезно предоставленной д-ром A. Grubb (Отдел биохимии Лундского Университета, Швеция). Для очистки IgA использовали Capture Select IgA аффинную матрицу фирмы Life Technologies (США), содержащую V_HH домен антител, распознающий все подклассы мономерного, димерного и секреторного IgA, конъюгированный с альдегид-активированной агарозой. Очистку IgA проводили с использованием FPLC хроматографической системы. Очищенный IgA был использован для иммунизации кроликов. Кроличий IgG с анти-IgA специфичностью был выделен из пула кроличьих сывороток посредством аффинной хроматографии на колонке Sepharose FF, конъюгированной с протеином G.

Экспериментальный гломерулонефрит. Моделирование постинфекционного гломерулонефрита выполняли на основании разрешения на работу с животными (Animal Welfare Assurance#A5243-01). Нефритогенность СГА генотипов *emm1* и *emm12* тестировали на кроличьей модели PSGN, описанной нами ранее [9]. Кратко ее схема заключается в следующем: микробные клетки, выращенные в бульоне Todd-Hewitt (Difco, США), убивали нагреванием при 60°C в течение 1,5 ч, обрабатывали 1М раствором KSCN для удаления связанных иммуноглобулинов и 6 раз отмывали PBS [9]. Взвесь бактерий в концентрации 10⁹/мл КФЕ вводили кроликам внутривенно 3 раза в неделю в течение 4 недель. К этому периоду, согласно нашим предшествующим данным [9], у кроликов были обнаружены первые гистоморфологические изменения в почечной ткани. Экспериментальные животные были произвольно разделены на две группы: первой группе продолжали вводить стрептококковые клетки, а второй группе — на фоне инъекций стрептококков вводили препараты Fc-фрагментов IgG кролика в концентрации 2 мг/мл. Через неделю

после последней инъекции почки обескровленных животных подвергали иммуноморфологическому и гистологическому исследованию.

Каждый тестируемый штамм испытывали минимум на 6 кроликах.

Экспериментальная модель IgA-гломеруло-нефрита с использованием СГА генотипа *emmM60* описана нами ранее [3]. Схема введения кроликам Fc-фрагментов IgG была аналогична описанной выше.

Иммуноморфологическое изучение почечной ткани. Почечная ткань каждого кролика подвергалась иммуногистохимическому исследованию в сочетании с технологией морфометрии для количественной оценки полученных данных.

Для выявления депозиции IgG в ткани использовали козьи сыворотки против кроличьего IgG. В качестве вторых антител применяли кроличьи анти-козьи антитела, меченные пероксидазой корня хрена (Southern Biotechnology Associates, США).

Для выявления депозиции IgA, тканевые срезы были обработаны кроличьим IgG с анти-IgA специфичностью. В качестве вторых антител использовали козьи антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена.

Для тестирования продукции IFN γ использовали моноклональные мышинные антитела против IFN γ , клон 25723, производства Sigma-Aldrich. Рабочее разведение 50 мкг/мл.

Депозицию С3 компонента комплемента определяли с помощью кроличьей сыворотки против С3 компонента комплемента человека (Daco, Дания), перекрестно реагирующего с С3 комплемента кролика. В качестве вторых антител использовали козьи антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена (Sigma, США).

Продукцию TNF α выявляли козьей анти-сывороткой против кроличьего TNF α (AMS Biotechnology, США) с последующей обработкой срезов кроличьими анти-козьими антителами, меченными пероксидазой.

Первоначально производили стандартную микроскопию тканевых образцов после их окрашивания гематоксилин-эозином при малых и средних увеличениях ($\times 100$ – 600) для оценки тканевых изменений в различных полях зрения. Затем иммуноокрашенные образцы исследовали при большем увеличении ($\times 900$ – 1100) с целью выявления депозиции IgG и С3, а также экспрессии TNF α и IFN γ .

Морфометрическая оценка изменений в почечной ткани производилась следующим образом: в корковом веществе в 10 произвольно выбранных полях зрения при увеличении $\times 700$ отдельно подсчитывали среднее количество нормальных и поврежденных гломерул.

Для определения области поврежденных проксимальных или дистальных канальцев в корковом или мозговом слое использовали стандартную морфометрическую сетку, большой квадрат которой состоял из 256 малых квадратов. Ее накладывали на поверхность исследуемого образца ткани и подсчитывали количество малых квадратов с деструктивно-дегенеративными изменениями в ткани. Полученную величину принимали за показатель степени тканевой альтерации. Подобный подход применяли и для оценки клеточной инфильтрации как в корковом, так и в мозговом слоях почек. Полученные результаты подвергали статистической обработке [11].

Результаты

Для получения сравнительных данных по изучению нефритогенной активности штаммов *S. pyogenes*, различающихся по Fc-связыванию IgG, IgG-содержащих иммунных комплексов и IgA, были отобраны СГА генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60* соответственно. Каждый штамм испытывали на трех кроликах. Полученные усредненные морфометрические результаты, оценивающие патоморфологическую активность каждого из использованных штаммов стрептококков, представлены в таблице 1.

Полученные данные указывают на то, что все отобранные штаммы обладали нефритогенностью с той лишь разницей, что штаммы *emm1* и *emm12*, в отличие от штамма *emm60*, приводили к развитию PSGN, между тем как штамм *emm60* приводил к проявлениям IgA-нефропатии. Поражение гломерул, вызванное штаммами *emm1* и *emm12*, имело место в 40–49% случаев, между тем как площадь поражения проксимальных и дистальных канальцев составляла $60,2 \pm 31$ – 116 ± 36 и $60,8 \pm 14,6$ – $110 \pm 41,5$ малых квадратов морфометрической сетки соответственно. Зона лимфоцитарной инфильтрации в корковом слое соответствовала $46,3 \pm 13$ – $68,5 \pm 24$, а в мозговом слое — $74,3 \pm 9,8$ – $94,3 \pm 30$ малым квадратам сетки. Соответствующие показатели для штамма *emm60* составляли: поражение гломерул — 43%, площади повреждения канальцев — $61,3 \pm 19$ и $62,8 \pm 14,6$, а площади лимфоцитарной инфильтрации — $51,3 \pm 13$ и $69,3 \pm 7,8$. Эти результаты послужили фоном для изучения влияния препаратов, очищенных Fc фрагментов нормального IgG кролика на вызываемые разными штаммами СГА процессы в почках (табл. 2, 3 и 4).

Результаты опытов свидетельствуют о том, что Fc-фрагменты IgG способны полностью подавлять только патологический процесс, вызванный СГА генотипа *emm1*, связывающим нативный IgG (табл. 2, рис., II обложка).

Таблица 1. Сравнительные морфометрические показатели нефритогенной активности штаммов *S. pyogenes*, различающихся по Fc-связыванию IgG, IgA и иммунных комплексовTable 1. Comparative morphometric data of nephritogenic activity of *S. pyogenes* strains differentiated by Fc-binding of IgG, immune complexes and IgA

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Результат Result
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation		
	в норме normal	поврежденных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**	
<i>emm1</i>	5,2±0,6	4,0±0,6	60,2±31	46,3±13	60,8±14,6	74,3±9,8	PSGN
<i>emm12</i>	5,0±0,8	4,9±0,4	116±36	68,5±31	110±41,5	94,3±30	PSGN
<i>emm60</i>	5,8±0,8	4,3±0,9	61,2±19	51,3±13	62,8±14,6	69,3±7,8	IgAN

Примечания. ПК* — проксимальный каналец; ЛИ** — лимфоцитарная инфильтрация; ДК*** — дистальный каналец.

PSGN — постстрептококковый гломерулонефрит; IgAN — IgA-нефропатия.

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. PSGN — poststreptococcal glomerulonephritis; IgAN — IgA-nephropathy)

Патологические процессы в почечной ткани, индуцированные штаммом *emm12* (связывает иммунные комплексы, но не нативный IgG), оказались подавленными Fc-фрагментами кроличьего IgG лишь частично, а индуцированные штаммом *emm60* (связывает только IgA), практически не были чувствительны к вводимым препаратам Fc-фрагментов кроличьего IgG.

Согласно данным таблицы 2, препарат Fc-фрагментов нормального IgG подавляет поражение клубочков и каналцев и препятствует развитию воспалительных проявлений в ткани: отложению IgG, C3 компонента комплемента, про-

дукции провоспалительных цитокинов TNF α и IFN γ , а также лимфоцитарной инфильтрации.

По данным таблицы 3, Fc-фрагменты нормального IgG лишь частично подавляют процесс, вызванный СГА генотипа *emm12*. Показатель повреждения клубочков сохранялся на уровне 37%, в то время как область поражения каналцев уменьшилась в 3,5–4 раза, с 110–116 малых квадратов сетки до 29–31. Значительно более чем в 4 раза подавлялся такой признак воспаления, как лимфоцитарная инфильтрация, а также отложение C3 компонента комплемента и продукция TNF α и IFN γ .

Таблица 2. Данные по подавлению PSGN, вызванного штаммом *S. pyogenes* генотипа *emm1*, Fc-фрагментами нормального IgGTable 2. Morphometric data on PSGN caused by IgGFc-binding strain *S. pyogenes* of *emm1* genotype and its inhibition by Fc-fragments of normal IgG

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Депозиция и продукция Deposition and expression		
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation		IgG	C3	TNF α IFN γ
	в норме normal	дефектных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**			
<i>emm1</i> + IgG Fc	Практически полностью отсутствуют признаки воспаления и поражения клубочков и каналцев There are almost no signs of inflammation and lesions of the glomeruli and tubules								
<i>emm1</i> (контроль) control	5,2±0,6	4,0±0,6	60,2±31	46,3±13	60,8±14,6	74,3±9,8	+	+	+

Примечания. ПК* — проксимальный каналец; ЛИ** — лимфоцитарная инфильтрация; ДК*** — дистальный каналец. (+) — выраженная депозиция иммуноглобулина G, комплемента и продукция интерлейкинов

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. (+) — strong disposition of IgG, complement and interleukin expression)

По данным таблицы 4 некоторое, крайне незначительное, ослабление воспаления наблюдалось и в опытах по испытанию активности СГА генотипа *emm60* в присутствии Fc-фрагментов IgG; оно касалось только степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации в зонах канальцев и продукции IFN γ .

Обсуждение

Если исходить из известных представлений об иммунокомплексной природе постстрептококковых поражений клубочкового аппарата почек, то логично допустить участие в формировании этих комплексов феномена Fc-связывания иммуноглобулинов Fc-рецепторными белками возбудителя и, в частности, их взаимодействия с мономерным IgG, с комплексами типа IgG–anti-IgG и с IgA. Во всех этих случаях в ответ на аутоантигенные превращения указанных иммуноглобулинов предполагается накопление в крови животного специфических антител к этим иммуноглобулинам. Образующиеся при этом комплексы откладываются в почечных клубочках посредством тканевых FcR, специфически отличающих один тип иммунных комплексов от другого [1, 6, 10, 15, 29]. Отложение комплексов в различных структурах ткани вызывает воспалительную реакцию с выбросом различных провоспалительных цитокинов, мобилизацию лимфоцитов/лейкоцитов и деструкцию подлежащей ткани. Характер этих изменений определяет патогенез конкретного проявления гломерулонефрита [6, 9, 23]. Именно эти различия и определили результаты настоящего исследования.

Согласно литературным данным и более ранним нашим [4, 8, 9] исследованиям, постстрептококковый гломерулонефрит известен как мембранозно-пролиферативный процесс, первично проявляющийся отложением IgG или IgG–anti-IgG иммунных комплексов в базальной мембране клубочков [4, 9, 21], между тем как для IgA-нефропатии свойственны отложения IgA или его полимеров в мезангиальных клетках клубочков, ведущие к мезангиально-пролиферативному гломерулонефриту [3, 18, 19, 20, 24]. За этими проявлениями фактически должно стоять реальное распределение соответствующих Fc-рецепторов в структурах гломерул. По-видимому, IgG Fc-рецепторы находятся преимущественно в капсуле [1, 9], а IgA Fc-рецепторы — в мезангиуме клубочков [22]. Очевидно, что тканевые FcR участвуют в утилизации «старееющих» молекул иммуноглобулина, но труднее справляются с их комплексными образованиями и связавшимся с ними С3 компонентом комплемента. Формирующаяся при этом реакция воспаления в ткани способствует ее повреждению. Очевидно, что с ростом образования комплексов возрастает и риск развития патологии. Возможно, именно поэтому IgG Fc-позитивные штаммы генотипа *emm12*, изначально обладающие способностью связывать иммунные комплексы, но не мономерный IgG, обладают и большей нефритогенностью в сравнении со штаммами других генотипов, связывающих мономерный IgG [2, 9, 10].

Приведенные рассуждения позволяют интерпретировать полученные в настоящей работе данные. Образующиеся при испытании

Таблица 3. Морфометрические показатели по подавлению процесса, вызванного штаммом *S. pyogenes* генотипа *emm12*, Fc-связывающим иммунные комплексы

Table 3. Morphometric data on the inhibition of pathological changes caused by the immune complexes binding *S. pyogenes* strain *emm12* genotype

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Депозиция и продукция Deposition and expression		
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation				
	в норме normal	дефектных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**	IgG	C3	TNF α IFN γ
<i>emm12</i> + IgG Fc	6,33	3,75	29,3	15,7	31,0	6,3	±	–	–
<i>emm12</i> (контроль) control	5,0±0,8	4,9±0,4	116±36	68,5±31	110±41,5	94,3±30	+	±	+

Примечания. ПК* — проксимальный каналец; ЛИ** — лимфоцитарная инфильтрация; ДК*** — дистальный каналец. Степень выраженности депозиции IgG, C3 комплемента и продукции интерлейкинов: (+) — выраженная, (+/-) — слабо выраженная, (–) — отсутствует.

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. The level of deposition of IgG, C3 complement and interleukin expression: (+) — pronounced, (+/-) — weakly expressed, (–) — absent.

Таблица 4. Морфометрические показатели по подавлению процесса, вызванного штаммом *S. pyogenes* генотипа *emm60*, Fc-связывающим IgA

Table 4. Morphometric data on the inhibition of pathological changes caused by the IgA binding *S. pyogenes* strain of *emm60* genotype

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Депозиция и продукция Deposition and expression		
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation		IgA	C3	IFN γ
	в норме normal	дефектных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**			
<i>emm60</i> + IgG Fc	6,4 \pm 0,8	3,7 \pm 0,8	43,0 \pm 34,3	9,3 \pm 4,1	47,5 \pm 31,1	16,0 \pm 28	+	+	-
<i>emm60</i> (контроль) control	5,8 \pm 0,8	4,3 \pm 0,9	61,2 \pm 19	51,3 \pm 13	62,8 \pm 14,6	69,3 \pm 7,8	+	\pm	+

Примечания. *ПК — проксимальный каналец; **ЛИ — лимфоцитарная инфильтрация; ***ДК — дистальный каналец. Степень выраженности депозиции IgG, C3 комплемента и продукции интерлейкинов: (+) — выраженная, (+/-) — слабо выраженная, (-) — отсутствует.

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. The level of deposition of IgG, C3 complement and interleukin expression: (+) — pronounced, (+/-) — weakly expressed, (-) — absent).

штаммов генотипов *emm1* и *emm12* иммунные комплексы ведут к их отложению в капсуле клубочков за счет их связывания с тканевыми FcR в структурах нефрона. Вводимые на начальных этапах процесса IgG Fc-фрагменты, а также иммунные комплексы будут конкурировать друг с другом за связь с тканевыми FcR, что может привести к подавлению воспаления, и к последующему повреждению ткани. По-видимому, именно это и произошло в опытах, результаты которых приведены в таблицах 2 и 3. При этом, гломерулонефрит, индуцированный СГА штаммом генотипа *emm12*, как более выраженный, значительно слабее поддавался блокирующему эффекту Fc-фрагментов IgG.

Так как бактериальные и тканевые IgA Fc-рецепторы значительно отличаются от IgG Fc-рецепторов естественно, что Fc-фрагменты IgG не способны были достаточно полно конкурировать с IgA за связь с IgA Fc-рецепторами. В силу этого Fc-фрагменты IgG не подавляли нефритогенность штамма генотипа *emm60*.

В последние годы поиск иных путей терапевтического воздействия на процессы иммунокомплексной природы привел к пониманию роли N-

и O-гликозилирования IgG и IgA в их патогенезе [12, 28]. Это обстоятельство, наряду с обнаружением бактериальных энзимов, позволяет разрабатывать универсальный путь борьбы не только с гломерулонефритами, но и с другими иммунопатологическими состояниями [5, 12].

Заключение

Испытание на нефритогенность штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60*, различающихся по Fc взаимодействию с IgG, иммунными комплексами и IgA, обнаружило разные по характеру процессы в почечной ткани экспериментального животного. Соответственно, патологические процессы, развивающиеся в почечной ткани, по-разному реагировали на внутривенное введение препарата Fc-фрагментов IgG нормального иммуноглобулина: он полностью подавлял развитие процесса, индуцированного штаммом *emm1* (связывает нативный IgG), частично подавлял процесс, вызванный штаммом *emm12* (связывает только иммунные комплексы) и не влиял на процесс, вызванный штаммом *emm60* (связывает IgA).

Список литературы/References

- Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В., Селиверстова В.Г., Нагорнев В.А., Шален К., Тотолян Артем А. Способность стрептококков группы А типа M12 связывать иммунные комплексы и их роль в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 623–630. [Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevskiy P.V., Seliverstova V.G., Nagornev V.A., Schalen K., Totolian Artem A. Capacity of group A (type M12) streptococci to bind immune complexes and their role in pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, vol. 8, no 5–6, pp. 623–630. doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-623-630. (In Russ.)]
- Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Кулешевич Е.В., Жарков Д.А., Шален К., Тотолян Артем А. Нефритогенная активность *Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1* и *emm12*, различающихся по источнику выделения // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 233–242. [Burova L.A., Pigarevskiy P.V., Snegova V.A., Kuleshevich E.V., Zharkov D.A., Schalen C., Totolian Artem A. Nephritogenic activity of *Streptococcus pyogenes* *emm1* and *emm12* genotypes isolated from pa-

- tients and asymptomatic carriers. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no 3, pp. 233–242. doi: 10.15789/2220-7819-2015-3-233-242. (In Russ.)]
3. Булова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Дуплик Н.В., Шален К., Тотолян Артем А. Нефритогенность IgA-связывающих *Streptococcus pyogenes*. Моделирование IgA гломерулонефрита // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 221–230. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Duplik N.V., Schalen K., Totolian Artem A. Nephritogenic activity of IgA-binding *Streptococcus pyogenes*. An experimental model of IgA glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no 3, pp. 221–230. (In Russ.)]
 4. Тотолян Артем А., Булова Л.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 78–90 [Totolian Artem A., Burova L.A. Fc-receptor proteins of *Streptococcus pyogenes* and pathogenesis of post-infection complications. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no 3, pp. 78–90. (In Russ.)]
 5. Allhorn M., Collin M. Sugar-free antibodies — the bacterial solution to autoimmunity. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2009, vol. 1173, pp. 664–669. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04739.x
 6. Akilesh Sh., Huber T.B., Wu H., Wang G., Hartleben B., Kopp J.B., Miner J.J.H., Roopenian D.C., Unanue E.R., Shaw A.S. Podocytes use fcR to clear IgG from the glomerular basement membrane. *PNAS*, 2008, vol. 105, no. 3, pp. 967–972. doi: 10.1073/pnas.0711515105
 7. Anthony R.M., Wermeling F., Ravetch J.V. Novel roles for IgG Fc glycan. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2012, vol. 1253, pp. 170–180. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06305.x170
 8. Barabas A.Z., Cole C.D., Lafreniere R., Weir D.M. Immunopathological events initiated and maintained by pathogenic IgG autoantibodies in an experimental autoimmune kidney disease. *Autoimmunity*, 2012, vol. 45, no. 7, pp. 495–509. doi: 10.3.109/089.934.2012.70281216
 9. Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevsky P.V., Gladilina M.M., Seliverstova V.G., Schalen C. Triggering of renal damage in the rabbit by IgG Fc-receptor-positive group A streptococci. *APMIS*, 1998, vol. 106, pp. 277–287.
 10. Burova L., Pigarevsky P., Duplik N., Snegova V., Suvorov A., Schalen C., Totolian A. Immune complex binding *Streptococcus pyogenes* type M12/emm12 in experimental glomerulonephritis. *J. Med. Microbiol.*, 2013, vol. 62, pt 9, pp. 1272–1280. doi: 10.1099/jmm.0.059196-0
 11. Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol. Res. Pract.*, 1984, no. 1, pp. 189–192.
 12. Collin M., Shannon O., Björck L. IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions. *Nat. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 11, pp. 4265–4270. doi: 10.1073/pnas.0711271105
 13. Danilova T.A. Fc receptors of endothelial cells of cardiac valves: comparison of IgG Fc binding activity of these receptors and of Fc receptors of group A streptococci. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2003, no. 2, pp. 46–51.
 14. Gomez-Guerrero C., Duque N., Casado M.T., Pastor C., Blanco J., Mampaso F., Vivanco F., Egidio J. Administration of IgG Fc-fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, pp. 2092–2101. doi: 10.4049/jimmunol.164/4.2092
 15. Hayes J.M., Frostell H.A., Cosgrave E., Strume W., Potter O., Davey G., Karisson R., Anneren C., Rudd P. Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *J. Proteome Res.*, 2014, vol. 13, no. 12, pp. 5471–5485. doi: 10.1021/pr500414q
 16. Hayes J.M., Cosgrave E.F., Struwe W.B., Wormald M., Davey G.P., Jefferis R., Rudd P.M. Glycosylation and Fc receptors. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 2014, vol. 382, pp. 165–199. doi: 10.1007/978-3-319-07911-08
 17. Haymann J.P., Delarue F., Baud L., Sraer J.D. Aggregated IgG bind to glomerular epithelial cells to stimulate urokinase release through an endocytosis independent process. *Nephron Exp. Nephrol.*, 2004, vol. 98, no. 1, pp. 13–21. doi: 10.1159/000079928
 18. Homma H., Tozawa K., Yasui T., Itoh Y., Hayashi Y., Kohri K. Abnormal glycosylation of serum IgG in patients with IgA nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2006, vol. 10, no. 3, pp. 180–185. doi: 10.1007/s10157-006-0422-y
 19. Monteiro R.C., Leroy V., Launay P., Moura I.C., Arcos-Fajardo M., Benhamou M., Haddad E. Pathogenesis of Berger's disease: recent advances on the involvement of immunoglobulin A and their receptors. *Med. Sci. (Paris)*, 2003, vol. 19, no. 12, pp. 1233–1241. doi: 10.1051/medsci/200319121233
 20. Monteiro R.C., Moura I.C., Launay P., Tsuge T., Haddad E., Benhamou M., Cooper M.D., Arcos-Fajardo M. Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy. *Trends Mol. Med.*, 2002, vol. 8, no. 10, pp. 464–468.
 21. Nordenfelt P., Waldemarson S., Linder A., Mörgelin M., Karlsson C., Malmström J., Björck L. Antibody orientation at bacterial surfaces is related to invasive infection. *Exp. Med.*, 2012, vol. 209, no. 13, pp. 2367–2381. doi: 10.1084/jem.20120325
 22. Okazaki K., Suzuki Y., Otsuji M., Suzuki H., Kihara M., Kajiyama T., Hashimoto A., Nishimura H., Brown R., Hall S., Novak J., Izui S., Hirose S., Tomino Y. Development of a model of early-onset IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2012, vol. 23, no. 8, pp. 1364–1374. doi: 10.1681/ASN.2011121160
 23. Qu Z., Cui Z., Liu G., Zhao M.H. The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. *BMC Immunol.*, 2013, vol. 14, pp. 19–26. doi: 10.1186/1471-2172-14-19
 24. Schmitt R., Ståhl A.L., Olin A.I., Kristoffersson A.C., Rebetz J., Novak J., Lindahl G., Karpman D. The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M Protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy. *J. Immunol.*, 2014, vol. 93, no. 1, pp. 317–326. doi: 10.4049/jimmunol.1302249.
 25. Sibéris S., Dutertre C.A., Boix C., Bonnin E., Ménez R., Stura E., Jorieux S., Fridman W.H., Teillaud J.L. Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett.*, 2006, vol. 106, no. 2, pp. 111–118. doi: 10.1016/j.imlet.2006.05.009
 26. Söderberg J.J., Pawel-Rammingen U. The streptococcal protease IdeS modulates bacterial IgG Fc binding and generates 1/2Fc fragments with the ability to prime polymorphonuclear leucocytes. *Mol. Immunol.*, 2008, vol. 45, no. 12, pp. 3347–3353. doi: 10.1016/j.molimm.2008.04.013
 27. Su Y.F., Chuang W.J., Wang S.M., Chen W.Y., Chiang-Ni C., Lin Y.S., Wu J.J., Liu C.C. The deficient cleavage of M protein-bound IgG by IdeS: insight into the escape of *Streptococcus pyogenes* from antibody-mediated immunity. *Mol. Immunol.*, 2011, vol. 49, no. 1–2, pp. 134–142. doi: 10.1016/j.molimm.2011.08.002

28. Van Timmeren M.M., van der Veen B.S., Stegeman C.A., Petersen A.H., Hellmark T., Collin M., Heeringa P. IgG glycan hydrolysis attenuates ANCA-mediated glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010, vol. 21, no. 7, pp. 1103–1114. doi: 10.1681/ASN.2009090984
29. Xue J., Zhu L.P., Wei Q. IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconj. J.*, 2013, vol. 30, no. 8, pp. 735–745. doi: 10.1007/s10719-013-9481-y
30. Yang R., Otten M.A., Hellmark T., Collin M., Björck L., Zhao M.H., Daha M.R., Segelmark M. Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, vol. 25, no. 8, pp. 2479–2786. doi: 10.1093/ndt/gfq115

Авторы:

Бурова Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Пигаревский П.В., д.б.н., руководитель отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Снегова В.А., научный сотрудник отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian Артем А., д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Pigarevsky P.V., PhD, MD (Biology), Head of the Department of General Morphology Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Snegova V.A., Researcher, Department of General Morphology Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian Artem A., PhD, MD (Medicine), RAS Full Member, Head Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.06.2019
Отправлена на доработку 02.03.2020
Принята к печати 14.03.2020

Received 18.06.2019
Revision received 02.03.2020
Accepted 14.03.2020

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛОВ, ПРЕДОБРАБОТАННЫХ ГОРМОНАМИ, С БИОПЛЕНКАМИ КОММЕНСАЛЬНОГО И УРОПАТОГЕННОГО ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI IN VITRO*

И.Л. Масленникова, И.В. Некрасова, Е.Г. Орлова, О.Л. Горбунова, С.В. Ширшев

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия

Резюме. Цель работы — изучить взаимодействие нейтрофилов, предобработанных хорионическим гонадотропином, эстриолом, кисспептином, лептином и грелином, с биопленками комменсального и уропатогенного штаммов *Escherichia coli*. Нейтрофилы периферической крови здоровых небеременных женщин I фазы менструального цикла ($n = 8$) культивировали в течение часа с гормонами в концентрации, соответствующей уровню I и III триместра беременности. Взаимодействие нейтрофилов с биопленками комменсального *E. coli* TG1 и уропатогенного *E. coli* DL82 (UPEC) штаммов оценивали после часового контакта. Биомасса биопленки штаммов, активность миелопероксидазы и катепсина G оценивалась спектрофотометрически на мультипланшетном ридере «Synergy™ H1» (BioTec, США). Установлено, что предобработка нейтрофилов хорионическим гонадотропином (10; 100 МЕ/мл), эстриолом (2; 20 нг/мл) и лептином (10 нг/мл) усиливала способность нейтрофилов разрушать опсонизированную биопленку только у комменсального штамма, не влияя на биопленку UPEC. Биомасса неопсонизированной биопленки комменсального *E. coli* TG1 снижалась после взаимодействия с нейтрофилами, предобработанными эстриолом (2 нг/мл), кисспептином (9,6 пМ) и грелином (0,83 нг/мл). Для UPEC только при действии на нейтрофилы хорионического гонадотропина (10 МЕ/мл) отмечено большее разрушение неопсонизированной биопленки как по сравнению с контролем, так и по сравнению с концентрацией гормона 100 МЕ/мл. Секретция миелопероксидазы повышалась при взаимодействии UPEC с нейтрофилами, предобработанными эстриолом в концентрации 2 нг/мл. При сравнении двух штаммов отмечено, что хорионический гонадотропин (10 МЕ/мл) и эстриол (20 нг/мл) усиливали активность миелопероксидазы нейтрофилов после взаимодействия с биопленками UPEC в большей степени по сравнению с биопленками *E. coli* TG1. Гормоны, эстриол (20 нг/мл) и кисспептин (9 пМ), снижали активность катепсина G нейтрофилов при взаимодействии с биопленками UPEC.

Ключевые слова: биопленки, *E. coli*, UPEC, нейтрофилы, хорионический гонадотропин, эстриол, лептин, грелин, кисспептин, катепсин G, миелопероксидаза.

Адрес для переписки:

Масленникова Ирина Леонидовна
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.
Тел.: 8 922 317-87-77 (моб.).
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Contacts:

Irina L. Maslennikova
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13,
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB of RAS.
Phone: +7 922 317-87-77 (mobile).
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Библиографическое описание:

Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л., Ширшев С.В. Взаимодействие нейтрофилов, предобработанных гормонами, с биопленками комменсального и уропатогенного штаммов *Escherichia coli* in vitro // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 64–72. doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1146

Citation:

Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Orlova E.G., Gorbunova O.L., Shirshv S.V. In vitro interaction of hormone-conditioned neutrophils with commensal and uropathogenic *Escherichia coli* biofilms // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 64–72. doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1146

© Масленникова И.Л. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IVI-1146>

IN VITRO INTERACTION OF HORMONE-CONDITIONED NEUTROPHILS WITH COMMENSAL AND UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* BIOFILMS

Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Orlova E.G., Gorbunova O.L., Shirshv S.V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Science, Perm, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to examine an interaction between neutrophils conditioned with chorionic gonadotropin, estriol, kisspeptin, leptin, ghrelin and commensal and uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. Peripheral blood neutrophils isolated from healthy non-pregnant women in the first phase of the menstrual cycle ($n = 8$) were cultured *in vitro* for 1 hour together with hormones at concentration corresponding to their level in the first and third trimester of pregnancy. An interaction of neutrophils with commensal *E. coli* TG1 and uropathogenic *E. coli* DL82 (UPEC) biofilms was assessed 1 hour later. The biofilm biomass, activity of myeloperoxidase and cathepsin G was measured spectrophotometrically on a microplate reader Synergy H1 (BioTec, USA). Neutrophils conditioned with chorionic gonadotropin (10; 100 IU/ml), estriol (2; 20 ng/ml) and leptin (10 ng/ml) were found to enhance their potential to destroy solely opsonized commensal *E. coli* biofilm, without affecting the UPEC biofilm. The biomass of non-opsonized biofilm of commensal *E. coli* TG1 decreased after interaction with neutrophils conditioned with estriol (2 ng/ml), kisspeptin (9.6 pM) and ghrelin (0.83 ng/ml). In contrast, non-opsonized UPEC biofilm was more destroyed by neutrophils exposed to low- vs. high-dose chorionic gonadotropin (10 IU/ml and 100 IU/ml, respectively) or control group. Myeloperoxidase secretion increased when UPEC interacted with neutrophils conditioned with estriol at concentration of 2 ng/ml. Comparing the two *E. coli* strains allowed to find that chorionic gonadotropin (10 IU/ml) and estriol (20 ng/ml) enhanced activity of neutrophil myeloperoxidase after interaction with UPEC biofilms to a greater extent than with *E. coli* TG1 biofilms. Estriol (20 ng/ml) and kisspeptin (9 pM) reduced activity of neutrophil cathepsin G after interaction with UPEC biofilms.

Key words: *biofilms, E. coli, UPEC, neutrophils, chorionic gonadotropin, estriol, leptin, ghrelin, kisspeptin, cathepsin G, myeloperoxidase.*

Введение

Микробные биопленки, оседлые сообщества микроорганизмов особого фенотипа, прикрепленные к субстрату или поверхности друг друга, погруженные во внеклеточный полимерный матрикс [13], рассматриваются как один из факторов патогенности оппортунистических бактерий. Более 65% микробных инфекций разных биотопов вызваны биопленкообразующими микроорганизмами [23]. Источником инфекции мочевыводящих путей (ИМП) в 62–80% случаев является *Escherichia coli* [7, 15, 55], причем среди изолятов могут встречаться уропатогенные *E. coli* (UPEC) и комменсальные штаммы *E. coli* [27, 31, 45]. UPEC имеет несколько факторов вирулентности, которые позволяют им колонизировать поверхность слизистых оболочек, образовывать биопленки или биопленкоподобные внутриклеточные сообщества в эпителиальных клетках, используя гемолизины, фимбрии, липополисахариды, секретируемые белки, капсулы и системы потребления железа [11, 15, 40, 46, 48, 50]. Элиминация из биопленок бактерий затруднена вследствие их устойчивости к различным антибиотикам и противомикробным механизмам клеток врожденного иммунитета.

Инфекция мочевыводящих путей — наиболее часто встречающееся заболевание во всем мире. Половина женщин до 32 лет хотя бы раз имели данные инфекции [33], в частности, возникающие при беременности. Это может регулироваться гормонами (эстрогенами), влияя, с одной стороны, на способность *E. coli* удер-

живаться на слизистых мочевыводящих путей и формировать биопленки [35]. С другой стороны, функциональная активность нейтрофилов, а именно микробицидный потенциал, также регулируется гормонами, такими как кисспептин, хорионический гонадотропин (ХГ), эстриол (E_3), лептин и грелин [1, 3, 4, 5, 9].

Бактериальные биопленки являются одной из главных причин персистирующих и тяжелых деструктивных инфекционных процессов [19]. Взаимодействие нейтрофилов с биопленками разных видов микроорганизмов характеризуется своими особенностями. Так, нейтрофилы могут разрушать биопленки *Staphylococcus aureus* [6] или закрепляться на поверхности у *Pseudomonas aeruginosa* [25], тем самым увеличивая биомассу. Не исключено, что тяжесть ИМП может определяться функциональной активностью нейтрофилов, а именно особенностями взаимодействия их с биопленочными бактериальными структурами в зависимости от гормонального фона, в частности при беременности.

Цель работы: изучить взаимодействие нейтрофилов, предобработанных ХГ, E_3 , кисспептином, лептином и грелином, с биопленками комменсального и уропатогенного штаммов *E. coli*.

Материалы и методы

Гормоны. Все гормоны использовались в концентрациях, соответствующих их уровню в I и III триместры беременности: кисспептин (кисспептин-54, Metastatin, Calbiochem, США) — 4,6 и 9,6 пМ [24]; ХГ (Profasi, Италия) — 100 и 10 МЕ/мл [10];

E_3 (Biomedical, Inc, Германия) — 2 и 20 нг/мл [26]; лептин (Sigma, США) — 10 и 35 нг/мл [20]; грелин (Sigma, США) — 1,2 и 0,8 нг/мл [16].

Штаммы бактерий. В работе использовали комменсальный штамм *Escherichia coli* TG1 (Ap^r) [2], способный образовывать массивную биопленку, уропатогенный штамм *E. coli* DL82 (UPEC), любезно предоставленный профессором M. Starcic Erjavec из коллекции биотехнологического университета Люблянского университета (Словения).

Выделение нейтрофилов и предобработка гормонами. Нейтрофилы периферической крови здоровых небеременных женщин I фазы менструального цикла ($n = 8$) выделяли на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 г/мл и 1,112 г/мл). Нейтрофилы культивировали в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия) с гормонами в течение часа в концентрациях, соответствующих уровню I и III триместра беременности. Затем нейтрофилы центрифугировали при 200g 5 мин, надсадочную жидкость удаляли. Клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640.

Анализ бактериальных биопленок. Биопленки штаммов *E. coli* TG1 (Ap^r), *E. coli* DL82 выращивали на среде LB (Luria-Bertani) (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 ч, затем 3-кратно отмывали физиологическим раствором. Часть пленок опсонизировали сывороткой крови человека (10% сыворотки в растворе Хенкса) в течение 15 мин. Нейтрофилы (100 мкл, 10^7 кл/мл), предобработанные гормонами, взаимодействовали с бактериальными биопленками 1 ч, затем межклеточный комплекс отмывали, высушивали и окрашивали 1% генцианвиолетом. К окрашенной биопленке добавляли 100 мкл 96% спирта и определяли оптическую плотность (ОП₅₈₀) на мультипланшетном ридере «Synergy™ H1» (BioТес, США) [42].

Оценка микробицидного потенциала нейтрофилов при взаимодействии с бактериальными биопленками. После взаимодействия нейтрофилов с опсонизированными бактериальными биопленками в течение 1 ч суспензия клеток осаждалась путем центрифугирования 10 мин при 200g. Супернатанты отбирали и замораживали при -20°C . Активность миелопероксидазы (МПО) тестировали с использованием хромогенного пероксидазного субстрата О-фенилендиамин дигидрохлорида (Sigma, США) в соответствии с инструкциями производителя. Реакцию останавливали 10% H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при 450 нм на мультипланшетном ридере «Synergy™ H1» (BioТес, США).

Активность катепсина G исследовали с использованием N-бензоил-L-тирозин гидрохлорида этилового эфира (Sigma, США), растворенного в метаноле. Оптическую плотность

измеряли при 256 нм 5 мин на мультипланшетном ридере «Synergy™ H1» (BioТес, США). Результаты рассчитывали согласно формуле Бугера–Ламберта–Бера, данные представляли в виде МЕ/мл.

Статистика. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического. Статистический анализ выполнен с применением парного t-критерия Стьюдента. Достоверность различий считали значимой при $p \leq 0,05$.

Результаты

Роль гормонов при взаимодействии нейтрофилов с биопленками комменсального штамма *E. coli* TG1. Результаты проведенных исследований позволили выявить, что опсонизация биопленок приводила к увеличению ее биомассы как в присутствии, так и в отсутствии нейтрофилов (табл. 1). В отсутствие гормонов нейтрофилы не разрушали биопленки. Предобработка нейтрофилов ХГ и E_3 при всех исследованных концентрациях вызывала эффективную деструкцию опсонизированной биопленки. Сходный эффект наблюдался при действии лептина, но только в концентрации, соответствующей I триместру беременности.

Способность нейтрофилов разрушать неопсонизированные биопленки комменсального *E. coli* TG1 усиливалась после их предобработки E_3 (2 нг/мл), кисспептином и грелином в концентрации III триместра беременности,

Деструктивное действие нейтрофилов на биопленки после предобработки гормонами не зависело от опсонизации, за исключением 2 нг/мл E_3 , где биомасса неопсонизированной биопленки после взаимодействия с нейтрофилами была ниже.

Роль гормонов при взаимодействии нейтрофилов с биопленками уропатогенного штамма *E. coli* DL82. Биопленкообразующая способность уропатогенного штамма была ниже, чем у комменсального (табл. 1). Опсонизация биопленки не приводила к увеличению ее биомассы. В отличие от комменсального штамма выявлена деструкция интактными нейтрофилами как опсонизированной, так и неопсонизированной биопленки *E. coli* DL82

В связи с этим, возможно, все изученные гормоны не влияли на способность нейтрофилов снижать биомассу опсонизированной биопленки. Только при действии ХГ (10 МЕ), в концентрации соответствующей уровню III триместра, отмечено большее разрушение неопсонизированной биопленки нейтрофилами.

Влияние гормонов на активность МПО и катепсина G нейтрофилов при взаимодействии с биопленками комменсального штамма *E. coli*

TG1. При взаимодействии нейтрофилов, преобработанных всеми исследованными гормонами, с биопленками комменсального штамма активность МПО не изменялась (табл. 2). В то же время отмечено достоверное снижение активности катепсина G нейтрофилов, преобработанных ХГ в обеих концентрациях, после взаимодействия с биопленками.

Влияние гормонов на активность МПО и катепсина G нейтрофилов при взаимодействии с биопленками уропатогенного штамма E. coli DL82. Активность МПО нейтрофилов, преобработанных E₃ вне зависимости от концентрации, увеличивалась при взаимодействии с биопленкой уропатогенного штамма (табл. 2).

При действии ХГ (100 МЕ) активность другого микробицидного агента, катепсина G, сни-

жалась. Напротив, лептин (35 нг/мл) и грелин (1,25 нг/мл) повышали активность катепсина G.

Лептин, в концентрации, соответствующей уровню III триместра (35 нг/мл), способствовал снижению активности МПО нейтрофилов, грелин — уменьшению активности катепсина G после взаимодействия с биопленками *E. coli* DL82.

Биопленки UPEC активировали МПО нейтрофилов сильнее после преинкубации с ХГ и E₃ в концентрациях, соответствующих III триместру беременности, по сравнению с комменсальным штаммом. Активность катепсина G нейтрофилов после преобработки E₃ и кисспептином в концентрациях III триместра при взаимодействии с биопленками UPEC, наоборот, снижалась.

Таблица 1. Биомасса биопленки комменсального *E. coli* TG1 и уропатогенного *E. coli* DL82 штаммов после взаимодействия с нейтрофилами, преобработанных гормонами, *in vitro*

Table 1. Biofilm biomass of commensal *E. coli* TG1 and uropathogenic *E. coli* DL82 strains after interaction with hormones exposure neutrophils *in vitro*

Варианты Variants	Концентрация (триместр беременности) Concentration (pregnancy trimester)	№ No.	<i>E. coli</i> TG1		<i>E. coli</i> DL82	
			Опсонизация/Opsonization			
			Есть Present	Нет Absent	Есть Present	Нет Absent
Без нейтрофилов Without neutrophils		1	1,90±0,08	1,70±0,09*	1,17±0,05	1,14 ±0,04
Контроль Control		2	1,84±0,11	1,70±0,11*	0,94±0,04 p ₁₋₂ ≤ 0,05	0,82±0,03* p ₁₋₂ ≤ 0,05
ХГ hCG	100 МЕ/мл (I)	3	1,58±0,11 p ₁₋₃ ≤ 0,05 p ₂₋₃ ≤ 0,05	1,50±0,10 p ₁₋₃ ≤ 0,05	0,98±0,04 p ₁₋₃ ≤ 0,05	0,81±0,04* p ₁₋₃ ≤ 0,05
	10 МЕ/мл (III)	4	1,48±0,09 p ₁₋₄ ≤ 0,05	1,33±0,09 p ₁₋₄ ≤ 0,05	0,88±0,05 p ₁₋₄ ≤ 0,05 p ₃₋₄ ≤ 0,05	0,76±0,04 p ₁₋₄ ≤ 0,05 p ₂₋₄ ≤ 0,05 p ₃₋₄ ≤ 0,05
Е3	2 нг/мл (I)	5	1,68±0,11 p ₂₋₅ ≤ 0,05	1,55±0,10 p ₁₋₅ ≤ 0,05 p ₂₋₅ ≤ 0,05	0,99±0,05 p ₁₋₅ ≤ 0,05	0,87±0,04* p ₁₋₅ ≤ 0,05
	20 нг/мл (III)	6	1,68±0,11 p ₂₋₆ ≤ 0,05	1,60±0,11 p ₂₋₆ ≤ 0,05	0,96±0,04 p ₁₋₆ ≤ 0,05	0,82±0,04* p ₁₋₆ ≤ 0,05
Кисспептин Kisspeptin	4,6 пМ (I–II)	7	1,72±0,12	1,59±0,10	1,00±0,04	0,84±0,04* p ₁₋₇ ≤ 0,05
	9,6 пМ (III)	8	1,70±0,11	1,60±0,11 p ₂₋₈ ≤ 0,05	1,01±0,05	0,87±0,04* p ₁₋₈ ≤ 0,05
Лептин Leptin	10 нг/мл (I)	9	1,76±0,11 p ₂₋₉ ≤ 0,05	1,68±0,11	0,96±0,04 p ₁₋₉ ≤ 0,05	0,81±0,03* p ₁₋₉ ≤ 0,05
	35 нг/мл (II–III)	10	1,82±0,12	1,69±0,10	0,98±0,05	0,84±0,04 p ₁₋₁₀ ≤ 0,05
Грелин Ghrelin	1,25 нг/мл (I)	11	1,75±0,12	1,63±0,11	0,94±0,04 p ₁₋₁₁ ≤ 0,05	0,84±0,04 p ₁₋₁₁ ≤ 0,05
	0,83 нг/мл (III)	12	1,77±0,13	1,60±0,10 p ₂₋₁₂ ≤ 0,05	0,96±0,05	0,84±0,04 p ₁₋₁₂ ≤ 0,05

Примечания. * — статистически достоверные отличия по t-критерию Стьюдента между величиной опсонизированных и неопсонизированных биопленок при p ≤ 0,05. ХГ — хорионический гонадотропин, Е3 — эстриол.

Notes. * — statistically significant differences between opsonized and non-opsonized biofilms according to Students t-test at p ≤ 0,05. hCG — human chorionic gonadotropin, E3 — estriol.

Обсуждение

В 80% случаев UPEC, принадлежащая к филогенетической группе B2, является этиопатогенным ИМП [34]. Комменсальные штаммы *E. coli* (филогенетическая группа A) являются менее вирулентными, однако их диссеминация в мочеполовом тракте также возможна при определенных условиях. Хотя среди уропатогенных и комменсальных штаммов *E. coli* не выявлено существенной разницы в способности формировать биопленку и уровне гидрофобности клеточной поверхности [21], однако на поверхности полистиролового планшета биомасса биопленки уропатогенного штамма *E. coli* DL82 была ниже, чем у комменсального, что может быть связано с тем, что в условиях *in vitro* UPEC полностью не реализуют свой потенциал биопленкообразования в силу разных причин [14, 36].

Внутри мочевыводящих путей бактерии *E. coli* должны преодолеть несколько линий защиты, среди которых наиболее эффективными являются нейтрофилы. Противодействие антимикробным механизмам врожденного иммунитета может достигаться усиленным синтезом структурных и функциональных белков клеточ-

ной оболочки *E. coli*, позволяя сохранять целостность бактериальной клетки [58]. Нейтрофилы играют ключевую роль в борьбе с патогенными микроорганизмами при развитии инфекции, осуществляя фагоцитоз, высвобождение токсичных ферментов, активных форм кислорода (АФК) из гранул или экстрацеллюлярных ловушек (NETs) [28, 44, 47]. Однако взаимодействие нейтрофилов с микроорганизмами в биопленках затруднено по сравнению с планктонными формами, вследствие отсутствия возможности прямого контакта нейтрофилов с частью популяции бактерий в толще биопленки [54], а также антифагоцитарного влияния структур внеклеточного матрикса биопленок [6].

Различная частота встречаемости ИМП у мужчин и женщин, а также различное проявление инфекционного процесса у женщин до и после менопаузы указывает на возможную роль гормонов в модуляции защитных функций [41]. Беременность рассматривается как один из факторов риска развития ИМП [37] в связи с изменениями гормонального фона. Нейтрофилы имеют рецепторы ко всем исследованным гормонам, что определяет возможность модуляции их функций [22, 38, 39, 49, 52].

Таблица 2. Микробицидный потенциал нейтрофилов, предобработанных гормонами, при взаимодействии с биопленками комменсального *E. coli* TG1 и уропатогенного *E. coli* DL82 штаммов *in vitro*

Table 2. Microbicidal potential of hormone exposure neutrophils while interacting with biofilms of commensal *E. coli* TG1 and uropathogenic *E. coli* DL82 strains *in vitro*

Варианты Variants	Концентрации (триместр беременности) Concentration (pregnancy trimester)	№ No.	МПО, ОП ₄₉₂ MPO, OD ₄₉₂		Cat G, мЕ/мл Cat G, mE/ml	
			<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> DL82	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> DL82
Контроль Control		1	0,053±0,001	0,053±0,001	20,05±2,38	11,14±3,49*
ХГ hCG	100 МЕ/мл (I)	2	0,054±0,002	0,054±0,001	7,64±3,60 p ₁₋₂ ≤ 0,05	4,45±3,12 p ₁₋₂ ≤ 0,05
	10 МЕ/мл (III)	3	0,053±0,001	0,063±0,006*	4,46±3,12 p ₁₋₃ ≤ 0,05	15,59±6,67
ЕЗ	2 нг/мл (I)	4	0,052±0,001	0,056±0,001 p ₁₋₄ ≤ 0,05	15,60±3,38	15,60±4,31
	20 нг/мл (III)	5	0,053±0,001	0,058±0,002* p ₁₋₅ ≤ 0,05	17,82±0,08	11,14±3,50*
Кисспептин Kisspeptin	4,6 пМ (I–II)	6	0,053±0,001	0,054±0,001	15,27±4,65	8,91±3,60
	9,6 пМ (III)	7	0,053±0,001	0,055±0,001	20,04±5,62	6,68±3,49*
Лептин Leptin	10 нг/мл (I)	8	0,054±0,002	0,055±0,001	15,59±4,32	13,37±4,76
	35 нг/мл (II–III)	9	0,053±0,001	0,053±0,001#	26,89±5,31	20,16±3,83 p ₁₋₉ ≤ 0,05
Грелин Ghrelin	1,25 нг/мл (I)	10	0,053±0,001	0,055±0,001	20,05±2,29	20,05±2,38 p ₁₋₁₀ ≤ 0,05
	0,83 нг/мл (III)	11	0,052±0,001	0,055±0,001	15,50±4,38	11,13±3,49#

Примечания. МПО — миелопероксидаза, Cat G — катепсин G; * — статистически достоверные отличия по t-критерию Стьюдента между уропатогенным и комменсальным штаммами *E. coli* при p ≤ 0,05; # — статистически достоверные отличия по t-критерию Стьюдента между концентрациями гормона в I и III триместрах беременности при p ≤ 0,05.

Notes. MPO — myeloperoxidase, Cat G — cathepsin G; * — statistically significant differences between uropathogenic and commensal *E. coli* strains according Student's t-test at p ≤ 0,05; # — statistically significant differences between hormone concentrations in the first and third trimesters of pregnancy according Student's t-test at p ≤ 0,05.

Несмотря на супрессивное действие вышеуказанных гормонов на фагоцитарную активность нейтрофилов [3, 4, 5, 8, 9, 29], влияние гормонов на антибиопленочную активность нейтрофилов не проявлялось в случае с UPEC, что, вероятно, связано с более сильным угнетающим воздействием бактериальных экзопродуктов.

Известно, что нейтрофилы узнают, адгезируются и фагоцитируют биопленки грамположительных бактерий *S. aureus* вне зависимости от опсонизации IgG и C3 [12, 51]. В настоящей работе нами показано, что опсонизация увеличивала биомассу биопленки комменсального штамма, не влияя на биомассу биопленки UPEC, что может свидетельствовать о низкой эффективности опсонизации этого штамма. После взаимодействия с нейтрофилами биомасса опсонизированной биопленки была достоверно выше неопсонизированной у обоих штаммов, что может быть обусловлено адгезией нейтрофилов на биопленке. Нейтрофилы после инкубации с ХГ и лептином (в концентрациях, соответствующих I триместру), и E₃, кисспептином (в обеих концентрациях) достоверно снижали только биомассу неопсонизированной биопленки UPEC по сравнению с опсонизированной. Хотя в статьях не отмечено деструктивное действие опсонингов на биопленки грамположительных бактерий, по всей видимости в случае грамотрицательных бактерий, опсонизация, как показано ранее, усиливала резистентность штаммов *E. coli* к киллингу нейтрофилами [18], что подтверждается и в нашей работе. Также, поскольку вариант взаимодействия нейтрофилов с неопсонизированными биопленками может выступать моделью протекания ИМП на фоне иммунодефицита, вероятно, что модулирование функциональных характеристик нейтрофилов гормонами, приводящее к деструкции биопленок уропатогенного штамма, имеет место только при условии дефицита или снижения активности системы комплемента.

Рассматривая возможный механизм деструкции биопленок *E. coli* нейтрофилами, можно предположить, что он не связан с фагоцитарной активностью из-за отсутствия прямого контакта между нейтрофилами и бактериями биопленок, а обусловлен продукцией АФК и секрецией ферментов азурофильных гранул. Ранее показано, что среди исследованных гормонов ХГ, лептин и грелин угнетали ЛЗХЛ нейтрофилов, а E₃ и кисспептин стимулировали [3, 4, 5, 8, 9]. Также протеомный анализ мочи при ИМП показал присутствие в ней 50% белков, специфичных для нейтрофилов, включая МПО и катепсин G [30, 58]. Поэтому МПО, катализируя образование хлорноватистой кислоты, также может являться ключевым компонентом цитотоксического потенциала нейтрофилов при взаимодействии

с биопленками комменсальной *E. coli* и UPEC на фоне гормонального окружения. Так, ранее показано, что ХГ, кисспептин, E₃ и лептин оказывали активирующее действие на активность МПО нейтрофилов и макрофагов [1, 4, 17, 53, 57]. По результатам нашей работы только E₃ (концентрация III триместра) стимулировал секрецию МПО нейтрофилами при взаимодействии их с биопленкой уропатогенного штамма. Тем не менее, активность МПО нейтрофилов, преобразованных ХГ и E₃ (концентрации III триместра), была выше при взаимодействии с менее массивной биопленкой UPEC, чем с биопленкой комменсального штамма. В отношении последних супрессия факторов иммунной системы является основной стратегией их выживания [23], поскольку предусматривает колонизацию биотопа хозяина, препятствуя проникновению других бактериальных патогенов. Это, по всей видимости, и определяло отсутствие влияния всех исследованных гормонов на продукцию МПО нейтрофилами при взаимодействии с биопленкой комменсала.

Согласно последним данным, нейтрофильные гранулярные протеазы, в число которых входит катепсин G, играют скорее регуляторную, чем микробицидную роль при инфекции [43, 56]. Отмечено присутствие в осадке мочи пептидов, характерных для катепсина G [58], что может быть обусловлено их протеолизом. Вероятно, этим объясняется снижение продукции катепсина G при взаимодействии нейтрофилов с биопленками уропатогенного штамма *E. coli* по сравнению с комменсальным. Что касается влияния гормонов на функциональную активность нейтрофилов, то при взаимодействии с биопленками комменсальной *E. coli* TG1 только ХГ снижал секрецию катепсина G. Если учесть, что данный гормон в концентрации, соответствующей I триместру беременности, способствовал разрушению биопленок данного штамма, то можно предположить, что супрессия секреции содержимого азурофильных гранул при действии гормона, по-видимому, не позволяет запускать дальнейшие механизмы иммунного ответа с привлечением макрофагов в зону воспаления. Таким образом, регуляция взаимодействия клеток врожденного иммунитета с комменсальной микрофлорой при гормональном воздействии позволяет сохранить баланс взаимоотношений микробиота–хозяин. Гормоны, грелин (концентрация I триместра) и лептин (концентрация III триместра), регулирующие метаболический обмен и синтезирующиеся плацентой во время беременности, напротив, активировали секрецию катепсина G нейтрофилами, но только при взаимодействии с биопленками UPEC. Учитывая регуляторный потенциал катепсина G, вероятно, что данный гормонально

обусловленный механизм может приводить к запуску дальнейших звеньев иммунного ответа при ИМП, обусловленных УРЕС.

Заключение

Гормоны, детектируемые в кровотоке при беременности, способны оказывать системное влияния на клетки иммунной системы, в том числе модулируя микробицидные и регуляторные механизмы нейтрофилов при взаимодействии с бактериальными биопленками при ИМП. В результате проведенных исследований показано, что разрушение нейтрофилами биопленок комменсального штамма *E. coli*, в отличие от УРЕС, может модулироваться ХГ, эстриолом и лептином в концентрациях, соответствующих уровню I триместра беременности. Дополнительно,

эстриол в данной концентрации ингибировал активность МПО, а ХГ — катепсина G нейтрофилов после взаимодействия с биопленками УРЕС. При воздействии на нейтрофилы гормонов в концентрациях, соответствующих уровню III триместра беременности, только эстриол усиливал деструкцию биопленок комменсала. Грелин и лептин активировали катепсин G нейтрофилов при концентрациях, соответствующих I и III триместру соответственно, при взаимодействии только с биопленками УРЕС. Таким образом, гормоны, продуцируемые плацентой во время беременности, способны избирательно и эффективно модулировать функциональную активность нейтрофилов, взаимодействующих с биопленками *E. coli* при ИМП.

Работа выполнена в рамках государственного задания, № Гос. регистрации: 01201353248.

Список литературы/References

1. Горбунова О.Л., Ширшев С.В. Комплексное исследование иммуномодулирующей активности кисспептина // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8, № 3. С. 288–290. [Gorbunova O.L., Shirshv S.V. Integrated study immunomodulatory activity of kisspeptine. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8, no. 3, pp. 288–290. (In Russ.)]
2. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2002. № 3. С. 20. [Danilov V.S., Zarubina A.P., Eroshnikov G.E., Solov'eva L.N., Kartashev F.V., Zavgilgelskiy G.B. The bioluminescent sensor systems with lux-operons from various species of luminescent bacteria. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya = Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 2002, no. 3, p. 20. (In Russ.)]
3. Куклина Е.М., Ширшев С.В. Регуляция окислительной активности нейтрофилов хорионическим гонадотропином. Роль женских половых стероидных гормонов // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2003. № 4. С. 399–404. [Kuklina E.M., Shirshv S.V. Regulation of oxidative activity of neutrophils by chorionic gonadotropin: the role of female steroid sex hormones. *Izvestiya rossijskoj akademii nauk. Seriya biologicheskaya = Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2003, vol. 30, no. 4, pp. 325–329. doi: 10.1023/A:1024853604934 (In Russ.)]
4. Некрасова И.В., Ширшев С.В. Женские половые стероидные гормоны в регуляции ферментативной активности нейтрофилов // Доклады академии наук. 2013. Т. 453, № 6. С. 690–693. [Nekrasova I.V., Shirshv S.V. Female sex steroid hormones in regulation of neutrophil enzymatic activity. *Doklady akademii nauk = Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2013, vol. 453, no. 1, pp. 312–315. doi: 10.7868/S0869565213360231 (In Russ.)]
5. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. модуляция лептином функциональной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови женщин // Цитокины и воспаление. 2007. Т. 6, № 3. С. 44–48. [Orlova E.G., Shirshv S.V. Modulation of women's peripheral blood neutrophils and monocytes functional activity with leptin. *Citokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2007, vol. 6, no. 3, pp. 44–48. (In Russ.)]
6. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д. Нейтрофилы и бактериальные биопленки: диалектика взаимоотношений // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 6. С. 105–112. [Chebotar I.V., Mayansky A.N., Konchakova E.D. Neutrophils and bacterial biofilms: dialectics of relationship. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 5, pp. 105–112. (In Russ.)]
7. Шипицына Е.В., Хуснутдинова Т.А., Савичева А.М., Айвазян Т.А. Инфекции мочевыводящих путей в акушерстве и гинекологии // Журнал акушерства и женских болезней. 2015. № 6. С. 91–104. [Shipitsyna E.V., Khusnutdinova T.A., Savicheva A.M., Ayvazyan T.A. Urinary tract infections in obstetrics and gynecology. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2015, no. 6, pp. 91–104. (In Russ.)]
8. Ширшев С.В., Масленникова И.Л., Некрасова И.В. Влияние секретиремых метаболитов *Escherichia coli* на функциональную активность нейтрофилов человека на фоне действия эстриола // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 5. С. 65–70 [Shirshv S.V., Maslennikova I.L., Nekrasova I.V. Effect of *Escherichia coli* secreted metabolites on functional activity of human neutrophils against the background of estriol effect. *Zhurnal mikrobiologii ehpideemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 5, pp. 65–70. (In Russ.)]
9. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Сабанцева Ю.П. Роль грелина в регуляции фагоцитарной и микробицидной активности нейтрофилов // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2015. № 4. С. 378–381. [Shirshv S.V., Orlova E.G., Sabantseva Y.P. Roles of the ghrelin in regulation of phagocytic and oxidative activity of neutrophils. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya = Perm University Biological Science Bulletin*, 2015, no. 4, pp. 378–381. (In Russ.)]
10. Cole L.A. hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2012, vol. 10, no. 24. doi: 10.1186/1477-7827-10-24
11. Coote J.G. The RTX toxins of Gram-negative bacterial pathogens: modulators of the host immune system. *Rev. Med. Microbiol.*, 1996, vol. 7, no. 1, pp. 53–62. doi: 10.1097/00013542-199601000-00006
12. Dapunt U., Hänsch G.M., Arciola C.R. Innate immune response in implant-associated infections: neutrophils against biofilms. *Materials (Basel)*, 2016, vol. 9, no. 5: E387. doi: 10.3390/ma9050387

13. Donlan R.M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis*, 2001, vol. 33, no. 8, pp. 1387–1392. doi: 10.1086/322972
14. Eberly A.R., Floyd K.A., Beebout C.J., Colling S.J., Fitzgerald M.J., Stratton C.W., Schmitz J.E., Hadjifrangiskou M. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* is favored under oxygen conditions that mimic the bladder environment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 10: E2077. doi: 10.3390/ijms18102077
15. Fattahi S., Kafil H.S., Nahai M.R., Asgharzadeh M., Nori R., Aghazadeh M. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. *GMS Hyg. Infect. Control*, 2015, vol. 10: 11. doi: 10.3205/dgkh000254
16. Fuglsang J., Skjaerbaek C., Espelund U., Frystyk J., Fisker S., Flyvbjerg A., Ovesen P. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2005, vol. 62, no. 5, pp. 554–559. doi: 10.1111/j.1365-2265.2005.02257.x
17. Gajewski M., Rzodkiewicz P., Gajewska J., Wojtecka-Łukasik E. The effect of leptin on the respiratory burst of human neutrophils cultured in synovial fluid. *Reumatologia*, 2015, vol. 53, no. 1, pp. 21–25. doi: 10.5114/reum.2015.50553
18. Gargan R.A., Brumfitt W., Hamilton-Miller J.M. Pre-opsonisation of *Escherichia coli* induces resistance to neutrophil killing in serum and urine: relationship to growth phase. *J. Med. Microbiol.*, 1991, vol. 35, no. 1, pp. 12–17.
19. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 95–108.
20. Hardie L., Trayhurn P., Abramovich D., Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1997, vol. 47, no. 1, pp. 101–106. doi: 10.1046/j.1365-2265.1997.2441017.x
21. Hashemizadeh Z., Kalantar-Neyestanaki D., Mansouri S. Association between virulence profile, biofilm formation and phylogenetic groups of *Escherichia coli* causing urinary tract infection and the commensal gut microbiota: a comparative analysis. *Microb. Pathog.*, 2017, vol. 110, pp. 540–545. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.046
22. Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm. IGF Res.*, 2009, vol. 19, no. 3, pp. 187–197. doi: 10.1016/j.ghir.2008.12.001
23. Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J. Oral. Microbiol.*, 2014, vol. 17, no. 6: 26102. doi: 10.3402/jom.v6.26102
24. Horikoshi Y., Matsumoto H., Takatsu Y., Ohtaki T., Kitada C., Usuki S., Fujino M. Dramatic elevation of plasma metastatin concentrations in human pregnancy: metastatin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, vol. 88, no. 2, pp. 914–919. doi: 10.1210/jc.2002-021235
25. Jesaitis A.J., Franklin M.J., Berglund D., Sasaki M., Lord C.I., Bleazard J.B., Duffy J.E., Beyenal H., Lewandowski Z. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 8, pp. 4329–4339. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4329
26. Kase N.G., Reyniak J.V. Endocrinology of pregnancy. *Mt. Sinai J. Med.*, 1985, vol. 52, no. 1, pp. 11–34.
27. Kazemnia A., Ahmadi M., Dilmaghani M. Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iran Biomed. J.*, 2014, vol. 18, no. 4, pp. 219–224. doi: 10.6091/ibj.1394.2014
28. Khan M.A., Philip L.M., Cheung G., Vadakepedika S., Grasemann H., Swezey N., Palaniyar N. Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase-Dependent NETosis. *Front. Med. (Lausanne)*, 2018, vol. 5, pp. 19. doi: 10.3389/fmed.2018.00019
29. Koca C., Şahin Kavaklı H., Alici O. Immunomodulatory role of leptin treatment in experimental sepsis caused by gram negative bacteria. *Turk. J. Med. Sci.*, 2011, vol. 41, no. 2, pp. 251–258. doi: 10.3906/sag-1009-1109
30. Lassek C., Burghartz M., Chaves-Moreno D., Otto A., Hentschker C., Fuchs S., Bernhardt J., Jauregui R., Neubauer R., Becher D., Pieper D.H., Jahn M., Jahn D., Riedel K. A metaproteomics approach to elucidate host and pathogen protein expression during catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs). *Mol. Cell Proteomics*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 989–1008. doi: 10.1074/mcp.M114.043463
31. Lee J.H., Subhadra B., Son Y.J., Kim D.H., Park H.S., Kim J.M., Koo S.H., Oh M.H., Kim H.J., Choi C.H. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2016, vol. 62, no. 1, pp. 84–90. doi: 10.1111/lam.12517
32. Li B., Zeng M., Zheng H., Huang C., He W., Lu G., Li X., Chen Y., Xie R. Effects of ghrelin on the apoptosis of human neutrophils in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, 2016, vol. 38, no. 3, pp. 794–802. doi: 10.3892/ijmm.2016.2668
33. Lichtenberger P., Hooton T.M. Antimicrobial prophylaxis in women with recurrent urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agent*, 2011, vol. 38, pp. 36–41. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.005
34. Lühje P., Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.*, 2014, vol. 65, pp. 337–372. doi: 10.1016/bs.ampbs.2014.08.006
35. Lühje P., Brauner H., Ramos N.L., Ovregaard A., Gläser R., Hirschberg A.L., Aspenström P., Brauner A. Estrogen supports urothelial defense mechanisms. *Sci. Transl. Med.*, 2013, vol. 5, no. 190, pp. 190ra80. doi: 10.1126/scitranslmed.3005574
36. Mann R., Mediati D.G., Duggin I.G., Harry E.J., Bottomley A.L. Metabolic adaptations of uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7, pp. 241. doi: 10.3389/fcimb.2017.00241
37. Matuszkiewicz-Rowińska J., MaŁyszko J., Wieliczko M. Urinary tract infections in pregnancy: old and new unresolved diagnostic and therapeutic problems. *Arch. Med. Sci.*, 2015, vol. 11, no. 1, pp. 67–77. doi: 10.5114/aoms.2013.39202
38. Molero L., García-Durán M., Diaz-Recasens J., Rico L., Casado S., López-Farré A. Expression of estrogen receptor subtypes and neuronal nitric oxide synthase in neutrophils from women and men: regulation by estrogen. *Cardiovasc. Res.*, 2002, vol. 56, no. 1, pp. 43–51.
39. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S., Matsumoto H., Hori A., Kanehashi K., Terao Y., Kumano S., Takatsu Y., Masuda Y., Ishibashi Y., Watanabe T., Asada M., Yamada T., Suenaga M., Kitada C., Usuki S., Kurokawa T., Onda H., Nishimura O., Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001, vol. 411, no. 6837, pp. 613–617.
40. Oliveira F.A., Paludo K.S., Arend L.N., Farah S.M., Pedrosa F.O., Souza E.M., Surek M., Picheth G., Fadel-Picheth C.M. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet. Mol. Res.*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 4114–4125. doi: 10.4238/2011
41. Olson P.D., Hruska K.A., Hunstad D.A. Androgens enhance male urinary tract infection severity in a new model. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016, vol. 27, no. 6, pp. 1625–1634. doi: 10.1681/ASN.2015030327
42. O'Toole G.F., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 54, pp. 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49

43. Pham C.T., Ivanovich J.L., Raptis S.Z., Zehnbauer B., Ley T.J. Papillon-Lefevre syndrome: Correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans. *J. Immunol.*, 2004, vol. 173, no. 12, pp. 7277–7281. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7277
44. Phan Q.T., Sipka T., Gonzalez C., Levraud J.P., Lutfalla G., Nguyen-Chi M. Neutrophils use superoxide to control bacterial infection at a distance. *PLoS Pathog.*, 2018, vol. 14, no. 7: e1007157. doi: 10.1371/journal.ppat.1007157
45. Ramos N.L., Sekikubo M., Dzung D.T., Kosnopfel C., Kironde F., Mirembe F., Brauner A. Uropathogenic Escherichia coli isolates from pregnant women in different countries. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 11, pp. 3569–3574. doi: 10.1128/JCM.01647-12
46. Rosen D.A., Hooton T.M., Stamm W.E., Humphrey P.A., Hultgren S.J. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.*, 2007, vol. 4, no. 12: e329. doi: 10.1371/journal.pmed.0040329
47. Schwab S., Jobin K., Kurts C. Urinary tract infection: recent insight into the evolutionary arms race between uropathogenic Escherichia coli and our immune system. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2017, vol. 32, no. 12, pp. 1977–1983. doi: 10.1093/ndt/gfx022
48. Schwartz D.J., Kalas V., Pinkner J.S., Chen S.L., Spaulding C.N., Dodson K.W., Hultgren S.J. Positively selected FimH residues enhance virulence during urinary tract infection by altering FimH conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 39, pp. 15530–15537. doi: 10.1073/pnas.1315203110
49. Shirai F., Kawaguchi M., Yutsudo M., Dohi Y. Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2002, vol. 196, no. 1–2, pp. 21–28. doi: 10.1016/S0303-7207(02)00228-9
50. Soto S.M., Smithson A., Martinez J.A., Horcajada J.P., Mensa J., Vila J. Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *J. Urol.*, 2007, vol. 177, no. 1, pp. 365–368. doi: 10.1016/j.juro.2006.08.081
51. Stroh P., Günther F., Meyle E., Prior B., Wagner C., Hänsch G.M. Host defence against Staphylococcus aureus biofilms by polymorphonuclear neutrophils: oxygen radical production but not phagocytosis depends on opsonisation with immunoglobulin G. *Immunobiology*, 2011, vol. 216, no. 3, pp. 351–357. doi: 10.1016/j.imbio.2010.07.009
52. Sun Z., Dragon S., Becker A., Gounni A.S. Leptin inhibits neutrophil apoptosis in children via ERK/NF-κB-dependent pathways. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 1: e55249. doi: 10.1371/journal.pone.0055249
53. Ujioka T., Matsukawa A., Tanaka N., Matsuura K., Yoshinaga M., Okamura H. Interleukin-8 as an essential factor in the human chorionic gonadotropin-induced rabbit ovulatory process: interleukin-8 induces neutrophil accumulation and activation in ovulation. *Biol. Reprod.*, 1998, vol. 58, no. 2, pp. 526–530.
54. Van Gennip M., Christensen L.D., Alhede M., Qvortrup K., Jensen P.Ø., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and Pseudomonas aeruginosa biofilms on silicone implants in vivo. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, no. 8, pp. 2601–2607. doi: 10.1128/IAI.06215-11
55. Vejborg R.M., Hancock V., Schembri M.A., Klemm P. Comparative genomics of Escherichia coli strains causing urinary tract infections. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, vol. 77, no. 10, pp. 3268–3278. doi: 10.1128/AEM.02970-10
56. Vethanayagam R.R., Almyroudis N.G., Grimm M.J., Lewandowski D.C., Pham C.T., Blackwell T.S., Petraitis R., Petraitis V., Walsh T.J., Urban C.F., Segal B.H. Role of NADPH oxidase versus neutrophil proteases in antimicrobial host defense. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 12: e28149. doi: 10.1371/journal.pone.0028149
57. Yang W.L., Ma G., Zhou M., Aziz M., Yen H.T., Mavropoulos S., Ojamaa K., Wang P. Combined administration of human ghrelin and human growth hormone attenuates organ injury and improves survival in aged septic rats. *Mol. Med.*, 2016, vol. 22, pp. 124–135. doi: 10.2119/molmed.2015.00255
58. Yu Y., Sikorski P., Bowman-Gholston C., Cacciabeve N., Nelson K.E., Pieper R. Diagnosing inflammation and infection in the urinary system via proteomics. *J. Transl. Med.*, 2015, vol. 13, pp. 111. doi: 10.1186/s12967-015-0475-3

Авторы:

Масленникова И.Л., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;
Некрасова И.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;
Орлова Е.Г., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;
Горбунова О.Л., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;
Ширшев С.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия.

Authors:

Maslennikova I.L., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;
Nekrasova I.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;
Orlova E.G., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;
Gorbunova O.L., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;
Shirshov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.02.2019
 Отправлена на доработку 04.06.2019
 Принята к печати 10.06.2019

Received 12.02.2019
 Revision received 04.06.2019
 Accepted 10.06.2019

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФРАГМЕНТОВ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА ВИРУСА ЗИКА С АНТИТЕЛАМИ СЫВОРОТОК ЛЮДЕЙ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ ФЛАВИВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Д.В. Шаньшин^{1,2}, А.Ю. Бакулина^{1,3}, Е.И. Казачинская¹, С.А. Пьянков¹,
А.А. Ильичев¹, Д.Н. Щербаков^{1,2}

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия

³ ФГБОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Возбудитель лихорадки Зика (ZIKV) принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Род флавивирусов включает в себя более 70 представителей. По структурной организации вириона и аминокислотному составу белков этот вирус сходен с другими флавивирусами, в том числе с вирусами денге (DENV), желтой лихорадки и Западного Нила (WNV), представляющими опасность для здоровья человека. ZIKV является арбовирусом и может переноситься различными видами комаров рода *Aedes*. Считается, что основные переносчики также способны переносить вирус денге, желтой лихорадки и другие флавивирусные инфекции. Впервые ZIKV был выделен в 1947 г. из образцов крови от макаки-резуса в лесу Зика (Уганда). Долгое время вирус не рассматривался как патоген опасный для человека, так как лихорадка Зика протекает в большинстве случаев бессимптомно. Однако анализ протекания лихорадки Зика во время беременности выявил связь этого заболевания с тяжелыми врожденными патологиями нервной системы, включая микроцефалию, после чего эта инфекция стала рассматриваться как опасная. Стремительное распространение вируса обозначило ряд проблем, с которыми столкнулись врачи. Одна из основных — отсутствие методов специфической диагностики этой инфекции. ZIKV обладает значительным антигенным сходством с другими флавивирусами. Большинство моноклональных антител к вирусу денге связываются с вирусом Зика. Это закономерно, если учитывать высокую степень сходства аминокислотных последовательностей полипротеина флавивирусов. Для исследования возможности дифференциальной диагностики флавивирусов, основанной на выявлении специфических антител, в работе было сконструировано несколько антигенов, содержащих фрагменты поверхностного белка E ZIKV. Для наработки рекомбинантных антигенов в клетках *E. coli* был выбран вектор рЕТ32. После получения конструкций, кодирующих белки ZEa187 и ZEa40, проводили наработку химерных белков в количествах, необходимых для проведения ИФА с сыворотками крови. Подготовка препаратов белков включала выделение белка из бактериальной биомассы путем лизиса с последующей хроматографической очисткой. Для изучения иммунохимических свойств химерных белков были использованы сыворотки крови

Адрес для переписки:

Шаньшин Даниил Васильевич
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор».
Тел.: 8 903 939-74-79 (моб.).
E-mail: shanshin dv@vector.nsc.ru

Contacts:

Daniil V. Shanshin
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector».
Phone: +7 903 939-74-79 (mobile).
E-mail: shanshin dv@vector.nsc.ru

Библиографическое описание:

Шаньшин Д.В., Бакулина А.Ю., Казачинская Е.И., Пьянков С.А., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н. Взаимодействие фрагментов оболочечного белка вируса зика с антителами сывороток людей, переболевших флавивирусными инфекциями // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 73–82. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-805

Citation:

Shanshin D.V., Bakulina A.Yu., Kazachinskaja E.I., Pyankov S.A., Ilyichev A.A., Scherbakov D.N. An interaction of Zika virus envelope fragments with serum antibodies derived from subjects after flavivirus infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 73–82. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-805

© Шаньшин Д.В. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AIO-805>

людей, переболевших лихорадками Зика, денге и Западного Нила. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки людей, не содержащие антител к флавивирусным инфекциям. При взаимодействии иммуноглобулинов класса М из сывороток больных флавивирусными инфекциями с ZЕa187 и ZЕa40 наблюдается высокий уровень перекрестного взаимодействия. При этом, несмотря на рост среднего сигнала специфического взаимодействия полученных белков с IgG сывороток ZIKV, наблюдается значительное перекрестное взаимодействие с IgG сывороток WNV и DENV. Таким образом, можно с определенной долей уверенности утверждать, что использование природных аминокислотных последовательностей поверхностного белка вируса Зика, выбранных для проведения данного исследования в качестве антигенов, в иммунохимических тестах не позволяет добиться высокой специфичности выявления антител.

Ключевые слова: вирус Зика, вирус денге, вирус Западного Нила, иммуноферментный анализ, перекрестное взаимодействие, рекомбинантные антигены.

AN INTERACTION OF ZIKA VIRUS ENVELOPE FRAGMENTS WITH SERUM ANTIBODIES DERIVED FROM SUBJECTS AFTER FLAVIVIRUS INFECTIONS

Shanshin D.V.^{a,b}, Bakulina A.Yu.^{a,c}, Kazachinskaja E.I.^a, Pyankov S.A.^a, Ilyichev A.A.^a, Scherbakov D.N.^{a,b}

^a State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrechnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^b Altai State University, Barnaul, Russian Federation

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The causative agent of Zika fever (ZIKV) belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. The flavivirus genus consists of more than 70 members. Based on virion structural organization and amino acid composition of proteins, this virus resembles other flaviviruses such as dengue (DENV), yellow fever and West Nile (WNV) posing a threat to human health. ZIKV is an arbovirus and may be transmitted by diverse mosquito species of the genus *Aedes*. It is believed that the main carriers are also able to transmit dengue virus, yellow fever virus as well as other flavivirus infections. In 1947, ZIKV was isolated for the first time from blood samples obtained from rhesus macaques inhabiting the Zika Forest (Uganda). Long time this virus was not considered as a dangerous to human pathogen, as Zika fever mostly occurs asymptotically. However, analysis of Zika fever course in pregnant women unveiled a link between this disease and severe congenital disorders of the nervous system, including microcephaly, that allowed to deal with it as a dangerous infection thereafter. Rapid ZIKV spread outlined a number of problems faced by medical doctors, among which the main issue was the lack of assays for its virus-specific diagnostics. ZIKV displays a marked antigenic similarity with other flaviviruses. The majority of dengue-specific monoclonal antibodies binds to Zika virus. It is expected given the high degree of amino acid sequence similarity found for flavivirus polyprotein. Several antigens bearing ZIKV E surface protein fragments were constructed to assess an opportunity for conducting differential diagnostics for distinct flaviviruses based on detection of virus-specific antibodies. Vector plasmid pET32 was selected for producing recombinant antigens in *E. coli* cells. After creating constructs encoding the ZЕa187 and ZЕa40 proteins, the chimeric proteins were produced in amount necessary for performing ELISA with blood serum samples. Protein samples were prepared by isolating them from bacterial biomass via lysis followed by chromatographic purification. Blood sera obtained from human subjects recovered after Zika, Dengue and West Nile fevers were used to examine immunochemical properties of chimeric proteins. Human sera containing no antibodies against flavivirus types were used as a negative control. It was found that serum IgM class antibodies derived from patients with flavivirus infections demonstrated a high level of cross-reactivity by interacting with ZЕa187 and ZЕa40. Upon that, despite increment of mean specific interaction signal observed for such proteins and IgG of ZIKV sera, a marked cross-reactivity with the IgG of WNV and DENV sera was found. Thus, with some certainty it may be concluded that in immunochemical assays use of natural amino acid sequence specific to Zika virus surface protein as antigenic material does not allow to achieve high specificity for antibody detection.

Key words: Zika virus, virus dengue, West Nile virus, ELISA, cross-reactivity, recombinant antigens.

Введение

Возбудитель лихорадки Зика (ZIKV) принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [30]. Род флавивирусов включает в себя более 70 представителей [3]. По структурной организации вириона и аминокислотному составу белков этот вирус сходен с другими флавивирусами, в том числе с вирусами денге (DENV),

желтой лихорадки (YFV) и Западного Нила (WNV), представляющими опасность для здоровья человека [10, 21]. ZIKV является арбовирусом и может переноситься различными видами комаров рода *Aedes*. В настоящее время считается, что его основными переносчиками являются комары вида *Aedes aegypti*, способные также переносить вирусы денге и желтой лихорадки [28].

Геном ZIKV состоит из одноцепочечной молекулы РНК длиной примерно 10 тыс. пар нуклеотидов, кодирующей полипротеин, который расщепляется на 3 структурных белка (капсидный — С, предшественник мембранного белка — рgM, оболочечный — Е) и 7 неструктурных белков [16].

Впервые ZIKV был выделен в 1947 г. из образцов крови от макаки-резуса в лесу Зика (Уганда). Долгое время вирус не рассматривался как патоген, опасный для человека [9, 20]. Лихорадка Зика протекает в большинстве случаев бессимптомно. Среди наиболее частых симптомов отмечаются макулопапулезные высыпания, лихорадка, миалгии и артралгии, головные боли и др. [8], и ее симптомы схожи с неосложненной лихорадкой денге. До недавнего времени случаи заболевания лихорадкой Зика регистрировались в основном в Африке и Юго-Восточной Азии. Однако в последние годы крупные вспышки этой болезни были зарегистрированы на территории Федеративных Штатов Микронезии на острове Яп в западной части Тихого океана в 2007 г., в 2015 г. в Бразилии, после чего вирус быстро распространился на другие южноамериканские страны [9, 20]. Анализ клинического течения лихорадки Зика во время беременности выявил связь этого заболевания с тяжелыми врожденными патологиями нервной системы, включая микроцефалию, после чего эта инфекция стала рассматриваться как опасная [12, 16, 29].

Стремительное распространение вируса обозначило ряд проблем, с которыми столкнулись врачи. Одна из основных — отсутствие методов специфической диагностики этой инфекции. Несмотря на существование высокоточных и высокоспецифичных методов обнаружения генетического материала вируса на основе ПЦР, исчерпывающая диагностика требует использования серологических методов обнаружения вирусных белков или вирусспецифичных антител.

ZIKV обладает значительным антигенным сходством с другими флавивирусами [1, 4]. Большинство моноклональных антител к вирусу денге связываются с вирусом Зика [19]. Это закономерно, если учитывать высокую степень сходства аминокислотных последовательностей полипротеина флавивирусов [26]. Если все флавивирусы имеют одну структурную организацию вирионов [14, 22, 24], и при этом наблюдается высокая степень гомологии аминокислотного состава [14], возможно ли, основываясь только на анализе антител сыворотки крови больного, дифференциально выявить инфекцию, вызванную вирусом Зика? Для ответа на этот вопрос в качестве объекта нашего исследования мы выбрали поверхностный белок Е вируса, выступающий первой мишенью для быстропротекающей лихорадки Зика.

Белок Е имеет молекулярную массу около 53 kDa и является основным поверхностным белком, который участвует во взаимодействии с клеточной мембраной [16]. Внеклеточная часть оболочечного белка ZIKV включает в себя три структурных домена (домены I, II и III). Все эти домены упакованы в вытянутую стержнеобразную структуру [25, 27]. Домен I имеет β -бочкообразную структуру и расположен в центре мономера. Домен II образован вытянутой палочкообразной структурой, отвечающей за процесс слияния мембран клетки-хозяина и вируса. Петля слияния во II домене является высококонсервативным участком в структуре поверхностного белка всех родственных флавивирусов. Домен III, отвечающий за начальное взаимодействие с клеточными рецепторами, менее консервативен по сравнению с доменами I и II [4].

Целью нашей работы было получение химерных белков, содержащих фрагменты белка Е ZIKV, и изучение их взаимодействия с антителами сывороток крови пациентов, перенесших лихорадку Западного Нила, денге, Зика.

Материалы и методы

Выравнивание аминокислотных последовательностей. Для выравнивания аминокислотных последовательностей белков Е различных флавивирусов и расчета идентичности использовалась программа BioEdit [17].

Получение рекомбинантных плазмид pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40. Синтез гена, кодирующего полноразмерный оболочечный белок вируса Зика штамма ZIKV/H. sapiens/Brazil/PE243/2015 [GenBank: KX197192.1], осуществлялся в ООО «ДНК-Синтез» (Россия). Последовательности gZEa187 и gZEa40, кодирующие аминокислотные фрагменты белка Е ZIKV, получали при помощи ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Нуклеотидную последовательность gZEa187 клонировали в составе экспрессионной плазмиды pET32a по сайтам рестрикции NcoI и XhoI, а последовательность gZEa40 — по сайтам XbaI и XhoI. Рекомбинантными плазмидами pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40 трансформировали клетки *E. coli* штамма Stb13 (Thermo Fisher Scientific, США) методом химической трансформации [5]. Клетки *E. coli* высевали на селективную среду, содержащую LB-агар и 100 мкг/мл ампициллина. Полученные колонии *E. coli* использовали для наработки плазмидной ДНК. Целостность рамки считывания проверяли с помощью рестрикционного анализа, ПЦР и секвенированием.

Индукция синтеза химерных белков ZEa187 и ZEa40. Для экспрессии генов, кодирующих

химерные белки ZЕa187 и ZЕa40, использовали клетки *E. coli* штамма KRX (Promega, США). Трансформацию компетентных клеток плазмидами рЕТ32а-ZЕa187 и рЕТ32а-ZЕa40 проводили химическим методом [5]. Индукцию проводили с помощью 0,1% L-рамнозы несколькими способами: 1) с добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в концентрации 1 мМ; 2) без добавления ИПТГ, 3) с добавлением ИПТГ в концентрации 1 мМ и в присутствии 0,4% глюкозы или без нее. Индукция по первым двум методам происходила следующим образом: свежую LB-среду инокулировали штаммами-продуцентами рЕТ32а-ZЕa187 и рЕТ32а-ZЕa40 в соотношении 1:100 и инкубировали в термостатируемом шейкере роторного типа при 180 об./мин при +24°C до достижения оптической плотности 0,6–0,8 о.е. при длине волны 600 нм. После этого для индукции экспрессии рекомбинантных генов добавляли L-рамнозу до конечной концентрации 0,1% с добавлением или в отсутствии ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. Инкубирование проводилось в течение 16 ч с последующим концентрированием клеток при помощи центрифугирования.

Индукцию синтеза ZЕa187 и ZЕa40 по третьему способу проводили следующим образом: в LB-агар добавлялись ампициллин и глюкоза в конечной концентрации 100 мкг/мл и 0,4% соответственно, с последующим высеванием на него штаммов-продуцентов рЕТ32а-ZЕa187 и рЕТ32а-ZЕa40. Инокулировали единичную колонию штамма-продуцента в свежую LB-среду с последующим культивированием при +24°C в течении 16 ч в термостатируемом шейкере роторного типа при 180 об./мин. По достижению оптической плотности 0,6–0,8 о.е. добавляли L-рамнозу и ИПТГ до конечной концентрации 0,1% и 1 мМ, соответственно, и инкубировали в течение 16 ч.

Аликвоты для анализа отбирали перед добавлением индуктора, через 1 ч, 2 ч и 4 ч после добавления индуктора. Контроль синтеза белка проводили при помощи электрофоретического разделения белков *E. coli* в денатурирующих условиях в 15% полиакриламидном геле по методу Лэмбли [23].

Сыворотки. В качестве контрольной панели сывороток, специфически взаимодействующих с антигенами ZIKV, использовали серию сывороток от пациента, переболевшего лихорадкой Зика в 2016 г., собранных в интервале от 8 до 20 дней от начала заболевания. Диагноз лихорадки Зика у пациента был подтвержден вирусологически (изоляция вируса) и при помощи секвенирования части генома с последующим депонированием последовательности (номер депонирования в GenBank, NCBI участка генома PНК: KU872850

от 07.03.2016 г.) [7]. В качестве контрольной панели, содержащей антитела к вирусу денге, использовали 7 сывороток переболевших лихорадкой денге, собранных с 7 по 15 день после проявления первых симптомов. Контрольная панель, содержащая антитела к ВЗН, содержала 26 сывороток от переболевших лихорадкой Западного Нила, собранных с 5 по 18 день. Сыворотки больных лихорадками Зика и денге были предоставлены ЦНИИ эпидемиологии, сыворотки больных лихорадкой Западного Нила — Волгоградским противочумным институтом. Постановка диагноза была проведена на основе методов ПЦР и ИФА диагностики. В качестве отрицательного контроля использовалась донорская неинфекционная плазма, предоставленная Новосибирской службой крови.

Получение природного антигена. Для получения природного инактивированного антигена ZIKV проводили наработку вируса в клетках Vero. Вирус из культуральной вирусосодержащей жидкости получали осаждением на низкоскоростной центрифуге после добавления полиэтиленгликоля с последующей очисткой ресуспендированного осадка ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Инактивация β-пропиолактоном заключалась в прогревании смеси антигена и 0,1% (v/v) β-пропиолактона в течение 2 ч при 37°C и постоянном перемешивании.

Очистка химерных белков. Очистку химерных белков ZЕa187 и ZЕa40 проводили с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Healthcare, США). Для получения клеточных лизатов биомассу осаждали при помощи центрифугирования при 6000g в течение 10 мин при +4°C, с последующим ресуспендированием в лизирующем буфере (30 мМ NaH₂PO₄, 20 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, 0,1% Triton X100, pH 7,4), дезинтегрировали при помощи ультразвука в течение 10 циклов по 90 с с перерывом 3 мин на льду. Клеточный лизат очищался от дебриса при помощи центрифугирования при 15 000g в течение 25 мин при +4°C. Связывание химерных белков с колонкой происходило при скорости 1,5 мл/мин. Далее следовала промывка колонки от несвязавшихся белков пятью объемами колонки при скорости потока промывочного буфера (30 мМ NaH₂PO₄, 40 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, pH 7,4) 2 мл/мин. Белки элюировали при помощи трех объемов колонки при скорости потока элюирующего буфера (30 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, pH 7,4) 1 мл/мин. Фракции собирали по 5 мл, концентрацию проверяли при помощи NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Использование химерных белков ZEa187 и ZEa40 в твердофазном иммуноферментном анализе. В качестве антигенов для сенсибилизации твердой фазы использовали очищенные химерные белки ZEa187 и ZEa40. Сенсибилизацию ячеек планшетов очищенными препаратами химерных белков с концентрацией 3 мг/мл выполняли в 0,15 М NaCl, с добавлением 0,02 М Трис HCl pH 7,4 (ТСБ, Трис солевой буфер) при +22°C в течение 18 ч. После трехкратной отмывки ТСБ с добавлением 0,05% твин-20 (ТСБ-Т) планшеты обрабатывали 1% раствором казеина в ТСБ-Т и инкубировали в течение 1 ч при +37°C. Затем раствор казеина удаляли и вносили в лунки планшета по 50 мкл тестируемых сывороток крови здоровых доноров и лиц, инфицированных ZIKV, DENV или WNV. Сыворотки инкубировали в течение 1 ч при +37°C. После трехкратной отмывки лунок ТСБ-Т в них добавляли пероксидазный конъюгат козьих антител Anti-Human IgG (полноразмерная молекула) (Anti-Human IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat, Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 1 ч при +37°C. После трехкратной отмывки лунок ТСБ-Т в них добавляли раствор субстрата, содержащий 0,1 мг/мл ТМБ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, США), и буфер, содержащий 0,02% H₂O₂, для окисления субстрата. Планшет (стрипы) инкубировали в защищенном от света месте в течение 15–20 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 М HCl и через 2–4 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре «Uniscan» (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ. Сравнение значений оптической плотности в разных группах проводилось с использованием непараметрического статистического критерия Манна–Уитни с помощью пакета R [6].

Результаты

Проведен отбор трех последовательностей, кодирующих фрагменты оболочечного белка E ZIKV (ZEa187 и ZEa40). Компьютерный анализ конструкций в программе SnapGene v3.2.1 показал, что химерные белки ZEa187 и ZEa40 имеют размер 355 а.о. и 194 а.о. с молекулярной массой 56,6, 38,6 и 21,0 kDa соответственно (рис. 1).

Получены рекомбинантные плазмиды pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40, содержащие в своем составе нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты оболочечного белка ZIKV.

Были получены штаммы-продуценты на основе клеток *E. coli* штамма KRX, трансформированные векторами pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40. Экспрессию генов gZEa187 и gZEa40 изучили в *E. coli* KRX при использовании в качестве индуктора 20%-го раствора L-рамнозы. Оптимальный режим для индукции экспрессии gZEa187 и gZEa40 составил 24°C в течение 18 ч.

Высокоочищенные химерные белки ZEa187 и ZEa40 получали с помощью хроматографии на Ni-IMAC сефарозе. Конечный выход продукта составил не менее 35 мг с 1 л культуры. Анализ очищенных белков проводился с помощью электрофореза в 15% SDS PAGE геле. Степень чистоты достигала 95–98%.

Изучено перекрестное взаимодействие антител сывороток крови, собранных во время острой и постинфекционной стадий лихорадки Зика, Западного Нила и денге, с антигенами ZEa187 и ZEa40 при помощи твердофазного ИФА. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Среднее значение ОП взаимодействия IgG сыворотки переболевшего лихорадкой Зика с белком ZEa187 составило 1,79, с белком ZEa40 — 0,72. Для фракции IgM аналогичные

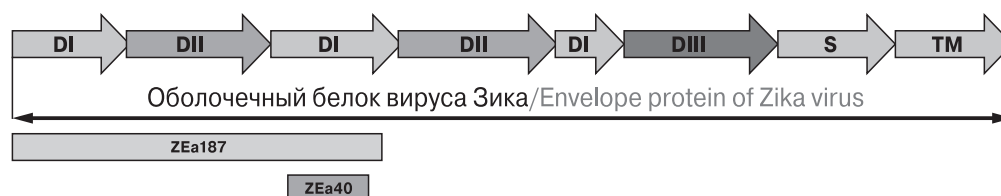


Рисунок 1. Схема строения оболочечного белка вируса Зика и его фрагменты, вошедшие в состав химерных белков

Figure 1. Diagram of the structure of the envelope protein of Zika virus and its fragments included in the chimeric proteins

DI — домен I, D II — домен II, D III — домен III, S — «ножка», TM — трансмембранный регион, ZEa187 — фрагмент химерного белка длиной 187 а.о., ZEa40 — фрагмент химерного белка длиной 40 а.о.

DI — domain I, D II — domain II, D III — domain III, S — “leg”, TM — transmembrane region, ZEa187 — chimeric protein fragment a length of 187 a.a., ZEa40 — chimeric protein fragment a length of 40 a.a.

значения составили 0,32 и 0,2 соответственно. Среднее значение ОП взаимодействия IgG сывороток больных ЛЗН с ZЕa187 составило 0,78 и 0,32 при взаимодействии с ZЕa40. Для фракции IgM аналогичные значения составили 0,83 и 0,25 соответственно. Среднее значение ОП взаимодействия IgG сывороток от больных лихорадкой денге с ZЕa187 составило 0,30, с ZЕa40 — 0,24. Для фракции IgM аналогичные значения составили 0,45 и 1,39 соответственно. Для антител сывороток условно здоровых доноров сигнал ОП не превышал значения 0,17.

Обсуждение

Быстрое распространение лихорадки Зика в 2015–2016 гг. стало причиной напряженной эпидемической ситуации. Вспышки лихорад-

ки в течение нескольких месяцев были зарегистрированы на территории стран Южной и Северной Америки и на островах Карибского бассейна, для которых она ранее не являлась эндемичной [32]. Были зафиксированы завозные случаи лихорадки Зика в Европе [10]. Несмотря на спад интереса к этой болезни, остается ряд вопросов, которые возникли в связи с этими вспышками. Одним из самых острых вопросов, возникших в момент массовой регистрации случаев лихорадки Зика, был вопрос корректной постановки диагноза. Это связано с тем, что симптомы лихорадки Зика сходны или даже идентичны симптомам, характерным для других флавивирусных лихорадок (денге, Западного Нила). Учитывая то, что распространение лихорадки Зика происходило на территориях, для которых лихорадки Западного Нила

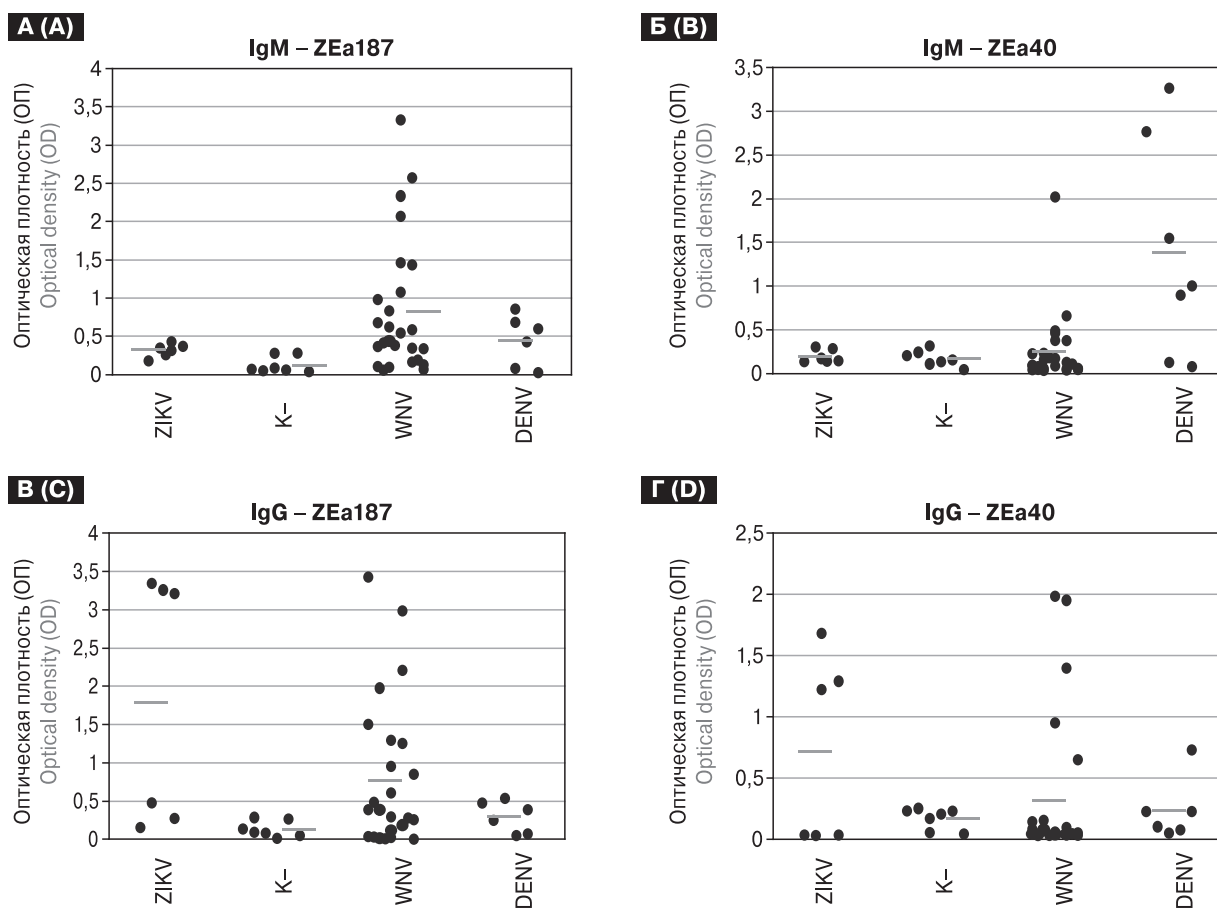


Рисунок 2. График распределения величины взаимодействия (ОП) химерных антигенов с антителами сывороток пациентов с диагнозом лихорадки Зика, Западного Нила и денге, а также с антителами сывороток, не содержащих антитела к флавивирусным инфекциям

Figure 2. Graph of the distribution of interaction (OD) values of chimeric antigens with serum antibodies of patients diagnosed with Zika fever, West Nile and dengue, as well as with serum antibodies that do not contain antibodies to flavivirus infections

A — ОП взаимодействия ZЕa187 с IgM; Б — ОП взаимодействия ZЕa40 с IgM; В — ОП взаимодействия ZЕa187 с IgG; Г — ОП взаимодействия ZЕa40 с IgG; ● — значение оптической плотности, — — среднее значение оптической плотности.
A — OD interaction ZЕa187 with IgM; B — OD interaction of ZЕa40 with IgM; C — OD of interaction of ZЕa187 with IgG; D — OD interaction ZЕa40 with IgG; ● — the value of optical density, — — the average value of optical density.

и денге являются эндемичными [1, 4], становятся понятными сложности, возникшие при диагностике этого заболевания. Для острой стадии инфекции, когда генетический материал возбудителя находится в организме, основным методом обнаружения является ПЦР, использование которой, действительно, позволяет идентифицировать возбудитель с высокой точностью. Однако этот метод становится бесполезным при элиминации возбудителя из организма. В этом случае основным способом зафиксировать факт перенесенной инфекции является использование иммунохимических методов [2].

Иммуноферментный анализ является одним из наиболее часто используемых методов клинической диагностики, что связано с его быстротой и низкой себестоимостью анализа. Однако перекрестная реакция антител с близкородственными флавивирусами ограничивает использование данного метода для дифференциальной диагностики этой группы вирусов [18]. Решением этой проблемы может быть поиск небольших фрагментов вирусного полипротеина гетерологичных по аминокислотному составу для разных видов флавивирусов, но гомологичных внутри вида.

Для исследования возможности дифференциальной диагностики флавивирусов, основанной на выявлении специфических антител, в работе было сконструировано несколько антигенов, содержащих фрагменты поверхностного белка E ZIKV. Делая такой выбор, мы основывались на следующих соображениях. Лихорадка Зика характеризуется быстрым течением [7, 11]. Логично ожидать, что за короткий период основной мишенью иммунной системы станут именно поверхностные белки, в то время как смещение иммунного ответа в сторону

внутренних белков требует длительной персистенции возбудителя в организме.

Исследования специфичности поликлональных антител, нарабатываемых в ответ на вирус денге у мышей, показали, что доминантной мишенью гуморального ответа является область домена III белка E (рис. 1) [13]. В то же время у человека основной мишенью выступает регион шарнирной области, который располагается в доменах I и II [15]. Учитывая высокую степень гомологии белков ZIKV и DENV, мы в своей работе сконцентрировали внимание на аминокислотной последовательности, включающей фрагменты доменов I и II белка E ZIKV. Последовательность ZЕa187 включает N-концевой регион, в том числе участки доменов I и II, а ZЕa40 фрагмент домена I, отличающийся, согласно данным биоинформатического анализа, в максимальной степени по аминокислотной последовательности от аналогичных поверхностных белков других флавивирусов (рис. 3). Необходимо отметить, что этот район не является однородным для самого ZIKV. Так, у некоторых штаммов подгруппы Zika 2 отсутствуют четыре аминокислоты (рис. 3).

Для наработки белков в клетках *E. coli* был выбран вектор рЕТ32, что позволяло получать интересные химерные белки с N-концевым «довеском», представленным последовательностью тиоредоксина. Включение последовательности тиоредоксина в ряде случаев позволяет увеличить растворимость химерного белка, а также его выход [31]. После получения конструкций, кодирующих белки ZЕa187 и ZЕa40, проводили наработку химерных белков в количествах, необходимых для проведения ИФА с сыворотками крови. Подготовка препаратов белков включала очистку из бактериальной биомассы путем ли-

	130	140	150	160	170	180	190	195
Zika 1	I	Q	P	E	N	L	E	Y
Zika 2	I	Q	P	E	N	L	E	Y
Dengue I	V	Q	Y	E	N	L	K	Y
Dengue II	V	Q	Y	E	N	L	E	Y
Dengue III	V	Q	Y	E	N	L	K	Y
Dengue IV	V	Q	I	E	N	L	E	Y
West Nile	I	Q	K	E	N	L	E	Y

Рисунок 3. Выравнивание фрагментов аминокислотных последовательностей домена I оболочечных белков флавивирусов

Figure 3. Alignment of the amino acid sequence fragments of the domain I of the flavivirus envelope proteins

Zika 1 — фрагмент оболочечного белка ZIKV, первой подгруппы штаммов; Zika 2 — фрагмент оболочечного белка ZIKV, второй подгруппы штаммов; Dengue I, II, III и IV — фрагмент оболочечных белков DENV четырех разных серотипов; West Nile — фрагмент оболочечного белка WNV. Жирным выделена аминокислотная последовательность, включенная в состав ZЕa40.

Zika 1 is a fragment of the ZIKV envelope protein, the first subgroup of strains; Zika 2 is a fragment of the ZIKV envelope protein, the second subgroup of strains; Dengue I, II, III and IV is a fragment of the DENV envelope proteins of four different serotypes; West Nile is a fragment of the WNV envelope protein. Bold highlighted amino acid sequence included in the composition of ZЕa40.

зиса и последующей металл-хелатной аффинной хроматографии, как это описано в разделе «Материалы и методы».

В первой серии экспериментов изучали взаимодействие иммуноглобулинов класса М сывороток крови больных с диагностированными лихорадками Зика, Западного Нила и денге с химерными белками ZEa187 и ZEa40. Как видно на рисунках 2а и 2б, ни в одной из сывороток больного лихорадкой Зика не наблюдается заметного уровня IgM против этих фрагментов. При этом для сывороток больных лихорадкой Западного Нила ОП при взаимодействии с ZEa187 в среднем достоверно выше, чем для отрицательного контроля ($p = 0,00069$). При сравнении результатов взаимодействия IgM сывороток с белками ZEa187 и ZEa40 можно отметить, что для белка размером 40 а.о. наблюдается уменьшение среднего уровня сигнала ОП для сывороток WNV ($p = 0,000086$), что, возможно, связано с уменьшением размера белка с 187 а.о. до 40 а.о. Для сывороток больных лихорадкой денге средний уровень сигнала ОП выше, чем средний уровень контроля, но эти результаты статистически не значимы ($p > 0,05$).

Следующим этапом исследования было изучение взаимодействия IgG сывороток крови с ZEa187 и ZEa40. Результаты проиллюстрированы на рисунках 2в и 2г. Видно, что в обоих случаях сыворотки больного лихорадкой Зика разделились на 2 группы: значения ОП в одной из групп близко к отрицательному контролю, в другой — больше, чем контроль ($p = 0,01667$). Для сывороток больных лихорадкой Западного Нила наблюдается та же картина, что и при исследовании IgM: ОП при взаимодействии с ZEa187 оказалась выше, чем для отрицательного контроля ($p = 0,03846$), и ОП при взаимодействии с ZEa40 ниже, чем с ZEa187 ($p = 0,04604$). Следует отметить, что в среднем для лихорадки денге не было значимого превышения ОП по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

Заключение

В результате работы были получены хроматографически очищенные химерные белки, содержащие фрагменты оболочечного белка E ZIKV. Проведено исследование взаимодействия полученных белков и антител сывороток больных лихорадкой Зика, лихорадкой Западного Нила и лихорадкой денге. При взаимодействии иммуноглобулинов класса М из сывороток больных флавивирусными инфекциями с ZEa187 и ZEa40 наблюдается высокий уровень перекрестного взаимодействия. При этом, несмотря на рост среднего сигнала специфического взаимодействия полученных белков с IgG сывороток ZIKV, наблюдается значительное перекрестное взаимодействие с IgG сывороток WNV и DENV. Таким образом, можно с определенной долей уверенности утверждать, что использование природных аминокислотных последовательностей поверхностного белка вируса Зика, выбранных для проведения данного исследования в качестве антигена в иммунохимических тестах, не позволяет добиться высокой специфичности выявления антител. Выходом из сложившейся ситуации может быть поиск новых антигенных детерминант вируса Зика с помощью биоинформатических методов. Такой поиск может привести к выявлению высококонсервативных и высокоспецифичных участков полипротеина, которые можно будет использовать для детекции взаимодействия с противовирусными антителами. Несомненно, свою роль могут сыграть методы комбинаторной биологии, например технология фагового дисплея, позволяющая тонко настроить используемые антигены на выявление антител только к вирусу Зика и отсекают взаимодействие с антителами родственных флавивирусов.

Работа поддержана ГЗ-10/18 «Разработка рекомбинантных видоспецифических антигенов опасных вирусов 2018–2020 гг.».

Список литературы/References

1. Иванов Д.О., Малиновская В.В., Тимченко В.Н., Каплина Т.А., Хакизимана Ж.К. Глобальные и педиатрические аспекты лихорадки Зика // Педиатр. 2016. Т. 7, № 1. С. 129–134. [Ivanov D.O., Malinovskaya V.V., Timchenko V.N., Kaplina T.A., Hakizimana J.-C. Global and pediatric aspects of Zika virus infection. *Pediatr = Pediatrician*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 129–134. doi: 10.17816/PED71129-134 (In Russ.)]
2. Калинина Е.И., Куличенко Т.В. Лихорадка Зика: основные факты об инфекции // Вопросы современной педиатрии. 2016. Т. 15, № 3. С. 257–262. [Kalinina E.I., Kulichenko T.V. Zika fever: basic facts about the infection. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2016, vol. 15, no. 3, pp. 257–262. doi: 10.15690/vsp.v15i3.1562 (In Russ.)]
3. Локтев В.Б. Флавивирусы, генетическое разнообразие и распространение в современном мире. В кн.: Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе. Новосибирск: Издательство «Ареал», 2016. С. 84–87. [Loktev V.B. Flaviviruses, genetic diversity and distribution in the modern world. In: *Diagnosis and prevention of infectious diseases at the present stage*. Novosibirsk: Areal, 2016, pp. 84–87. (In Russ.)]
4. Малхазова С.М., Миронова В.А. Проблема новых и возвращающихся инфекции: задачи медико-географического изучения // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. 2017. № 1. С. 21–31. [Malkhazova S.M., Mironova V.A. The problem of new and returning infections: the task of medical-geographical study. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Geografiya. Geoekologiya. = Proceedings of Voronezh State University. Series: Geography. Geoecology*, 2017, no. 1, pp. 21–31. (In Russ.)]

5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 240–241. [Maniatis T., Fritch E., Sambbruk G. Methods of genetic engineering. Molecular cloning. Moscow: Mir, 1984, pp. 240–241. (In Russ.)]
6. Мастицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. М.: ДМК Пресс, 2015. 496 с. [Mastitsky S.E., Shitikov V.K. Statistical analysis and data visualization using R. Moscow: DMK Press, 2015. 496 p. (In Russ.)]
7. Покровский В.И., Малеев В.В., Краснова С.В., Сметанина С.В., Вдовина Е.Т., Котив С.И., Карань Л.С., Федорова М.В., Григорьева Я.Е., Валдохина А.В., Карганова Г.Г., Шипулин Г.А. Первый случай лихорадки Зика в России // Инфекционные болезни. 2016. Т. 14, № 1. С. 90–95. [Pokrovskiy V.I., Maleev V.V., Krasnova S.V., Smetanina S.V., Vdovina E.T., Kotiv S.I., Karan L.S., Fedorova M.V., Grigor'eva Ya.E., Valdokhina A.V., Karganova G.G., Shipulin G.A. The first case of Zika fever in Russia. *Infektsionnye bolezni = Clinical Observation*, 2016, vol. 14, no. 1, pp. 90–95. doi: 10.20953/1729-9225-2016-1-90-95 (In Russ.)]
8. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Бородай Н.В., Шпак И.М., Куличенко А.Н., Михеев В.Н., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Лихорадка Зика: состояние проблемы на современном этапе // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 1. С. 5–12. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Boroday N.V., Shpak I.M., Kulichenko A.N., Mikheev V.N., Maleev V.V., Shipulin A.G. Zika fever: the current state of the issue. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 1, pp. 5–12. doi: 10.21055/0370-1069-2016-1-5-12 (In Russ.)]
9. Рябинина Л.А., Кнышова Л.П. Лихорадка Зика — глобальная угроза здоровью нации // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. № 4–5. С. 92–93. [Ryabina L.A., Knyshova L.P. Zika fever — a global threat to the health of the nation. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk = Actual Problems of the Humanities and Natural Sciences*, 2016, no. 4–5, pp. 92–93. (In Russ.)]
10. Хасанова Г.М., Исхаков Э.Р., Хасанова А.Н. Аналитический обзор распространения заболевания, вызываемого вирусом Зика // Международный академический вестник. 2016. № 4. С. 29–31. [Khasanova G.M., Iskhakov J.R., Khasanova A.N. Dissemination of virus Zika disease (analytic review). *Mezhdunarodnyy akademicheskyy vestnik = International Academic Bulletin*, 2016, no. 4, pp. 29–31. (In Russ.)]
11. Шестакова И.В. Болезнь, вызванная вирусом зика: новый взгляд на известную болезнь // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 5–18. [Shestakova I.V. Zika virus disease: a new look at a well-known disease. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 5–18. (In Russ.)]
12. Calvet G., Aguiar R.S., Melo A.S., Sampaio S.A., De Filippis I., Fabri A., Araujo E.S.M., de Sequeira P.C., de Mendonça M.C.L., Oliveira L., Tschoeke D.A., Schrago C.G., Thompson F.L., Brasil P., dos Santos F.B., Nogueira R.M.R., Tanuri A., de Filippis A.M.B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, vol. 16, no. 6, pp. 653–660. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
13. Campos J.L.S., Poggianella M., Marchese S., Mossenta M., Rana J., Arnoldi F., Bestagno M., Burrone O.R. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 7: e0181734. doi: 10.1371/journal.pone.0181734
14. Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R., Rice C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1990, vol. 44, no. 1, pp. 649–688. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
15. Chaudhury S., Gromowski G.D., Ripoll D.R., Khavrutskii I.V., Desai V., Wallqvist, A. Dengue virus antibody database: Systematically linking serotype-specificity with epitope mapping in dengue virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11, no. 2: e0005395. doi: 10.1371/journal.pntd.0005395
16. Faye O., Freire C.C., Iamarino A., Faye O., de Oliveira J.V.C., Diallo M., Zanotto P.M. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 1: e2636. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636
17. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, vol. 41, no. 41, pp. 95–98.
18. Houghton-Triviño N., Montaña D., Castellanos J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Revista de Salud Publica*, 2008, vol. 10, no. 2, pp. 299–307.
19. Kam Y.W., Lee C.Y.P., Teo T.H., Howland S.W., Amrun S.N., Lum F.M., See P., Kng N.Q.R., Huber R.G., Xu M.H., Tan H.L., Choo A., Maurer-Stroh S., Ginhoux F., Fink K., Wang C.I., Ng L.F.P., Rénia L. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. *JCI Insight*, 2017, vol. 2, no. 8. doi: 10.1172/jci.insight.92428
20. Koenig K.L. Quarantine for Zika Virus? Where is the Science? *Disaster Med. Public Health Prep.*, 2016, vol. 10, no. 5, pp. 704–706. doi: 10.1017/dmp.2016.56
21. Kostyuchenko V.A., Lim E.X.Y., Zhang S., Fibriansah G., Ng T.S., Ooi J.S.G., Shi J., Lok S.M. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 2016, vol. 533, no. 7603, p. 425. doi:10.1038/nature17994
22. Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay R., Chipman S.P., Strauss E.G., Baker T.S., Strauss J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 2002, vol. 108, no. 5, pp. 717–725. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00660-8
23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
24. Li L., Lok S.M., Yu I.M., Zhang Y., Kuhn R.J., Chen J., Rossmann M.G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, 2008, vol. 319, no. 5871, pp. 1830–1834. doi: 10.1126/science.1153263
25. Mossenta M., Marchese S., Poggianella M., Campos J.S., Burrone O.R. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, vol. 492, no. 4, pp. 579–586. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.022
26. Priyamvada L., Quicke K.M., Hudson W.H., Onlamoon N., Sewatanon J., Edupuganti S., Pattanapanyasat K., Chokephaibulkit K., Mulligan M.J., Wilson P.C., Ahmed R., Suthar M.S., Wrarmert J. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, vol. 113, no. 28, pp. 7852–7857. doi: 10.1073/pnas.1607931113

27. Rai R., Dubey S., Santosh K.V., Biswas, A., Mehrotra, V., Rao D.N. Design and synthesis of multiple antigenic peptides and their application for dengue diagnosis. *Biologicals*, 2017, vol. 49, pp. 81–85. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.08.005
28. Roth A., Mercier A., Lepers C., Hoy D., Duituturaga S., Benyon E., Guillaumot L., Souares Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections — an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveill.*, 2014, vol. 19, no. 41, pp. 20929.
29. Ventura C.V. Maia M., Bravo-Filho V., Góis A.L., Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet*, 2016, vol. 387, no. 10015, p. 228. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00006-4
30. Weber D.S., Alroy K.A., Scheiner S.M. Phylogenetic Insight into Zika and emerging viruses for a perspective on potential hosts. *EcoHealth*, 2017, vol. 14, no. 2, pp. 214–218. doi: 10.1007/s10393-017-1237-x
31. Wong S.H. Cloning of flavin reductase into pET32a (+) expression vector lacking the thioredoxin A tag to study solubility of EDTA monooxygenase A in overexpression systems. *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, 2005, vol. 8, pp. 59–66.
32. World Health Organization et al. Zika virus, microcephaly and Guillain-Barré syndrome situation report. 2016.

Авторы:

Шаньшин Д.В., младший научный сотрудник ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; младший научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия;

Бакулина А.Ю., к.б.н. старший научный сотрудник ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; зав. лабораторией, факультет естественных наук ФГБОУ УВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия;

Казачинская Е.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. сектором гибридных технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Пьянков С.А., зав. лаборатории производства средств иммунодиагностики ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Ильичев А.А., д.б.н., профессор, начальник отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Щербakov Д.Н., к.б.н., зав. лабораторией иммунохимии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; ведущий научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия.

Authors:

Shanshin D.V., Junior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Junior Researcher, Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, Barnaul, Russian Federation;

Bakulina A.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Head of the Laboratory, Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation;

Kazachinskaja E.I., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Hybridoma Sector Manager, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Pjankov S.A., Head of the Laboratory for the Production of Immunodiagnosics, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Ilyichev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Scherbakov D.N., PhD (Biology), Head of Immunochemistry Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Leading Researcher, Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, Barnaul, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.09.2019
Отправлена на доработку 27.09.2019
Принята к печати 26.11.2019

Received 12.09.2019
Revision received 27.09.2019
Accepted 26.11.2019

АНЕСТЕЗИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ

А.П. Семакова, В.Г. Германчук, В.В. Рогожин, Н.Ю. Шавина, М.В. Овчинникова,
Т.Ю. Кириллова, Л.Ф. Ливанова, Н.И. Белякова

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов, Россия*

Резюме. Для анестезии животных в ветеринарной практике успешно применяются такие препараты, как Ксила, Золетил 100, а так же Аерран (Изофлуран). Определена возможность применения парентерального наркоза препаратами Золетил 100 в комбинации с миореалаксантом Ксила у кроликов-продуцентов, используемых для получения натуральной кроличьей сыворотки, которая в дальнейшем идет для производства диагностических сывороточных и иммуноглобулиновых препаратов. Введение препаратов в ушную вену не вызывает трудностей в выполнении, животное входит в наркоз мгновенно, что позволяет проводить фиксацию на станке безопасно для сотрудников и без дополнительного стресса у животного. Данный вид анестезии позволяет достичь требуемой глубины наркоза и поддерживать его до окончания процедуры кровопускания. Параметры, характеризующие состояние сердечно-сосудистой системы под влиянием средств анестезии оставались в пределах допустимой нормы. Препараты не снижают частоту сердечных сокращений, позволяя получить достаточный объем крови. Применение ингаляционной анестезии с Аерраном у лабораторных животных позволяет достичь требуемой глубины наркоза и поддерживать ее до завершения всей процедуры, однако необходимо наличие специализированного оборудования, обученного персонала и соответствующих навыков. Использование для этих целей Ксилы, как мононаркоза не рекомендуется, так как препарат обладает слабым анальгезирующим эффектом и сильными гипотензивными свойствами, снижая количественный показатель взятой крови. Определили, что вводимые животным средства анестезии, такие как Ксила, Золетил 100, Аерран при тотальном обескровливании не влияли на специфическую активность иммунных сывороток. Титры антител не снижались на протяжении всего срока наблюдения (до 12 месяцев) и соответствовали требованиям нормативной документации. В производстве химической вакцины холерной таблетированной в экспериментах на кроликах-сосунках, используемых на различных этапах контролей сырья, при проведении хирургических вмешательств также показана целесообразность замены устаревшего метода анестезии с применением диэтилового эфира на комбинацию более безопасных современных препаратов Золетил 100 и Ксилы. Изученные препараты Ксила, Золетил 100, Аерран не влияют на количество получаемой крови у животных-доноров, иммунологические качества сыворотки и готового диагностического препарата, безопасны для животных любых возрастов, что соответствует требованиям,

Адрес для переписки:

Семакова Анна Петровна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8452) 26-21-31 (служебн.).
E-mail: Semakova.ap@gmail.com

Contacts:

Anna P. Semakova
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone: +7 (8452) 26-21-31 (office).
E-mail: Semakova.ap@gmail.com

Библиографическое описание:

Семакова А.П., Германчук В.Г., Рогожин В.В., Шавина Н.Ю.,
Овчинникова М.В., Кириллова Т.Ю., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И.
Анестезия лабораторных животных в производстве диагностических
и профилактических биомедицинских препаратов // Инфекция
и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 83–89. doi: 10.15789/2220-7619-AOL-810

Citation:

Semakova A.P., Germanchuk V.G., Rogozhin V.V., Shavina N.Yu.,
Ovchinnikova M.V., Kirillova T.Yu., Livanova L.F., Belyakova N.I. Anesthesia
of laboratory animals in manufacturing of diagnostic and preventive
biomedicines // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 83–89. doi: 10.15789/2220-7619-AOL-810

необходимым для анестезии животных-биомodelей и животных-продуцентов в производстве иммунобиологических препаратов. Проведенные нами исследования позволили более гуманно проводить эксперименты с использованием лабораторных животных.

Ключевые слова: анестезия, анальгезия, ингаляционный наркоз, лабораторные животные, эксперимент, иммунобиологические препараты.

ANESTHESIA OF LABORATORY ANIMALS IN MANUFACTURING OF DIAGNOSTIC AND PREVENTIVE BIOMEDICINES

Semakova A.P., Germanchuk V.G., Rogozhin V.V., Shavina N.Yu., Ovchinnikova M.V., Kirillova T.Yu., Livanova L.F., Belyakova N.I.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Preparations such as XilaVet, Zoletil 100 as well as Aeranne (Isoflurane) are successfully applied for animal anesthesia in veterinary practice. We assessed a possibility of using parenteral narcosis with Zoletil 100 in combination with muscle relaxant Xila for producer-rabbits involved in manufacturing of natural rabbit serum subsequently deployed for production of diagnostic serum and immunoglobulin preparations. Administration of preparations into auricular vein is easy to do, while animals are sedated immediately allowing for safe fixation on restraining table and causing no additional stress for biomodels. This type of narcosis provides for expected depth of anesthesia and its maintenance until the end of blood-letting procedure. Parameters characterizing the state of cardiovascular system due to anesthetic products remained within the permitted limits. These preparations do not reduce heart beat rate allowing for collecting sufficient blood volumes. Application of inhalation anesthesia with Aeranne in laboratory animals provides for the specified depth of anesthesia and its maintenance until the end of the whole procedure. However, it requires specialized equipment and highly trained personnel with appropriate skills. Usage of Xila as a mono narcosis is not recommended as exhibits weak analgesic effects and strong hypotensive activity by decreasing quantity of collected blood volume. It was found that anesthetics such as Xila, Zoletil 100, Aeranne did not affect specific activity of immune sera in case of total dehematizing procedure. Moreover, antibody titers were not declined throughout entire observation (12 months) period and complied with the requirements of regulatory documentation. In addition, a feasibility of replacing old-fashioned anesthesia method with diethyl ether for a combination of safer contemporary preparations of Zoletil 100 and Xila was demonstrated while manufacturing tableted chemical cholera vaccine in experimental series with suckling rabbits used at diverse stages of raw material verification during surgical interventions. Xila, Zoletil 100, and Aeranne examined by us had no impact on the amount of blood obtained from donor-animals, immunological properties of the sera and ready-to-use diagnostic preparations. Such drugs were safe for all-age animals that comply with the requirements to anesthesia of animal biomodels and producer-animals in manufacturing of immunobiological preparations. Thus, our study allowed to conduct experiments with laboratory animals in a more humane manner.

Key words: anesthesia, analgesia, inhalation narcosis, laboratory animals, experiment, immunobiological preparations.

Прогресс современной лечебно-профилактической медицины во многом обязан экспериментальным исследованиям на животных. В полной мере это относится к созданию более безопасных и эффективных современных вакцин нового поколения. Наряду со средствами профилактики инфекционных болезней разрабатываются и производятся различные диагностические сыворотки и тест-системы, позволяющие выявить возбудителя в макроорганизме. Все эти разработки невозможны без многочисленных опытов на биомodelях. Лабораторных животных иммунизируют, заражают возбудителями особо опасных инфекций, проводят различные хирургические вмешательства, используют в качестве доноров для получения иммунных сывороток, глобулинов и т.д. Все эти процедуры зачастую болезненные и являются фактором стресса для животных, что может влиять на получаемые результаты.

Современные отечественные и зарубежные регламентирующие документы категорически запрещают проводить опыты на животных без применения адекватной анестезии [5, 10].

В научных институтах, занимающихся исследованиями в области медицины и микробиологии, в обязательном порядке создаются комиссии по биоэтике, которые контролируют программу работы с животными внутри учреждения. Все эксперименты на животных комиссия одобряет коллегиально. Выбору и применению средств анестезии уделяется особое внимание. Каждый экспериментатор в своей работе должен понимать, что те манипуляции, которые вызывают боль у людей, вызывают боль и у животных [6]. Поэтому необходимо быть опытным наблюдателем и уметь распознавать признаки боли. В случае невозможности использования средств анестезии, если нарушается «чистота» эксперимента, работа обсуж-

дается и обосновывается в биоэтической комиссии. Для животных создаются максимально комфортные условия.

Ветеринарная анестезиология активно развивается наряду с общей анестезиологией. Применяемые в прошлые годы препараты, такие как хлороформ и эфир, уходят на задний план. Появились новые группы препаратов, более безопасные, как для экспериментатора, так и для животного. Применение различных методов и приемов позволяет достичь разной степени обезболивания от местной анестезии, применения миорелаксантов, до глубокой анестезии при полостных хирургических вмешательствах. Известно, что при многокомпонентной комбинации эффект общей анестезии достигает более совершенного уровня [2], поэтому в экспериментальных исследованиях для получения достоверного результата поиск адекватной защиты животного от стрессовых ситуаций требует своего решения.

Наличие современных средств анестезии, использование наркозно-дыхательной аппаратуры, обученный персонал — все это дает возможность более квалифицированно проводить анестезию, что, в какой-то степени, является основой успешного проведения оперативных вмешательств и проявления акта гуманизма к животным.

До недавнего времени считалось, что введение лабораторным животным любых средств анестезии может исказить картину эксперимента и повлиять на качество выпускаемого иммунобиологического препарата [3, 16]. Это мнение небезосновательно. Поэтому каждое исследование необходимо рассматривать отдельно, чтобы развеять сомнения в этом вопросе.

Целью данной работы явилось изучение возможности использования анестетиков и подбор адекватных методов анестезии при проведении ряда хирургических манипуляций на биомоделях и животных-продуцентах в производстве иммунобиологических препаратов.

Материалы и методы

Лабораторные животные. В работе использовали кроликов породы Шиншилла массой 2,5–3,0 кг, крольчат-сосунков этой же породы массой 100–120 г. Биомоделей содержали на стандартном рационе в соответствии с требованиями санитарно-гигиеническими нормами и регламентирующими документами по содержанию инфицированных животных [11, 12, 13].

Препараты и оборудование для анестезии. Для инъекционного наркоза использовали ветеринарный препарат Ксила (действующее вещество ксилазина гидрохлорид) (Interchemie, Эстония); Золетил 100 (тилетамин, золепам), (Virbac, Франция).

Для газовой анестезии применяли Аерран (Изофлуран) (Baxter, США).

Для ингаляционного введения использовали наркозный аппарат Moduflex (Dispomed) и кислородный концентратор Армед.

Для удобства разведения малых доз препаратов инъекционного наркоза использовали дозаторы Biohit, объемом 100 и 1000 мкл.

Развернутая реакция агглютинации. Образцы иммунных сывороток разводили 0,9% раствором натрия хлорида рН (7,6±0,1) с таким расчетом, чтобы получить последовательные двукратные разведения, начиная с 1:50. Готовили взвесь штаммов холерного вибриона по стандартному образцу [ОСО 42-28-86-2018 (5 МЕ)], эквивалентных концентрации 1×10^9 м.к./мл [12]. К 0,5 мл каждого разведения испытуемых сывороток добавляли по 0,5 мл приготовленной микробной взвеси холерных вибрионов. Одновременно ставили контроли: 1) антигена (к 0,5 мл микробной взвеси холерного вибриона добавляли 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида); 2) сыворотки (к 0,5 мл сыворотки в разведении 1:50 добавляли 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида). Штативы с пробирками встряхивали, инкубировали при температуре (37±1)°С в течение 2 ч и учитывали предварительный результат. Окончательный учет результатов проводили через 18–20 ч, выдержав пробирки при температуре (20±1)°С. Учет результатов реакции проводили по четырехкрестовой системе. Реакцию считали положительной при агглютинации на 3–4 креста. В пробирках с контролями сыворотки и культуры агглютинации быть не должно.

Внутрикишечное заражение кроликов-сосунков. В производстве вакцины холерной бивалентной химической, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, для определения активности фракций вакцины и контроля производственных штаммов, используют тест синдрома холерогенности на модели кроликов-сосунков [15].

Результаты

Одними из самых востребованных экспериментальных биомоделей являются кролики определенных пород. В исследованиях применяют животных разных возрастов: как взрослых, молодых особей, так и кроликов-сосунков.

Кроликов используют в качестве животных-продуцентов иммунной сыворотки крови, которая является полуфабрикатом диагностических сывороточных и иммуноглобулиновых препаратов. Животных-продуцентов иммунизируют по определенной схеме и на завершающем этапе проводят тотальный забор крови. Обескровливание является одной из самых тяжелых для восприятия манипуля-

ций. Считалось, что любой препарат, вводимый кролику для обезболивания, может повлиять на качество сыворотки и соответственно выпускаемой продукции, поэтому манипуляция по забору крови от начала до конца проводилась без анестезии [3, 16].

В работе по обескровливанию мы использовали ветеринарные препараты, успешно применяемые врачами ветеринарных клиник как для парентерального введения (Ксила, Золетил 100), так и для ингаляционного наркоза — Аерран (Изофлуран). В связи с отсутствием регламентированной литературы, дозировки препаратов подбирали самостоятельно, используя литературные данные [14].

В качестве продуцентов использовали только здоровых животных. Доставленных из питомника кроликов осматривал ветеринарный врач и помещал в карантин, чтобы исключить занос инфекции в виварий. Животных взвешивали, все данные фиксировали в учетной документации.

Кроликов иммунизировали одним и тем же иммунным препаратом в течение 1,5 месяцев по схеме, применяемой для данного антигена, далее брали пробную порцию крови для определения титров антител. Если титры антител соответствовали нормативной документации, то животных готовили к проведению кровопускания. За 12 часов до забора крови доноров сажали на голодную диету, чтобы исключить липемию. Для правильного расчета препаратов для анестезии кроликов еще раз взвешивали, так как за 1,5 месяца они, скорее всего, увеличивались в весе.

Апробировали три варианта анестезии. В качестве сравнения брали группу кроликов без применения анестетиков. Премедикацию животным не делали.

Чтобы оценить физиологическое состояние животного под влиянием средств анестезии изучали параметры, характеризующие состояние сердечно-сосудистой системы: наличие сердечного выброса, давление крови, а также параметры дыхательной системы: частота и глубина дыхания. Степень вхождения животных в наркоз оценивали по наличию рефлексов: пальцебральный рефлекс, нистагм (подергивание глазного яблока), корнеальный рефлекс (роговичный), расслабление мышц (при разрезе скальпелем нет подергивания мышечных волокон), покалывание, пощипывание [9].

Первой опытной группе кроликов вводили Ксилу. Данный ветеринарный препарат относится к группе миореалаксантов. Вызываемый им эффект характеризуется как соноподобное состояние, умеренная анальгезия, расслабление скелетной мускулатуры [7]. Кроликам препарат вводили внутримышечно из расчета 0,2 мл/кг. Средняя масса кролика в группе — 3 кг, по-

этому вводили 0,6 мл внутримышечно в бедро. Время для достижения миорелаксационного эффекта составляло от 10 до 15 мин. У животных наблюдалось замедление сердечного ритма, понижение температуры тела, расслабление мышц скелетной мускулатуры и ослабление болевой чувствительности на непродолжительное время, которого было недостаточно для проведения процедуры кровопускания.

Второй группе животных для усиления анестезиологического эффекта Ксилу комбинируют с Золетилом 100. Данный препарат применяется для общей анестезии животных. Двухкомпонентный состав препарата, состоящий из тилетамина и золепама, позволяет оказывать седативное, миореалаксирующее, а также угнетающее действие на центральную нервную систему, избирательно прерывая проводимость ассоциативных проводящих путей головного мозга [7]. Комбинацию препаратов вводили внутривенно в ушную вену. Кролик погружался в наркоз мгновенно, «на конце иглы». Полностью обездвиженным, его фиксировали к станку. На протяжении всей манипуляции животные этой группы находились в состоянии наркоза, отмечалось четкое сердцебиение, что позволило забрать достаточное количество крови. Смерть от гиповолемии наступила также в состоянии наркоза.

Третьей группе животных вводили ингаляционный препарат Аерран, относящийся к анестетикам второго поколения. К положительным свойствам препарата необходимо отнести отсутствие токсичности препарата и плохую растворимость газа в системе «кровь : липиды». Однако он выраженно угнетает дыхание, может вызывать умеренную тахикардию, артериальную гипотонию [8].

Газовая смесь, состоящая из Аеррана в концентрации 3,5% и чистого кислорода 0,8%, подавалась при помощи наркозно-дыхательного оборудования. Индукция в наркоз составила 5–7 мин. Фиксировали животных на станке в состоянии наркоза. Поддержание анестезии велось на протяжении всей процедуры забора крови. У животных значительно ослабевали рефлексы, у некоторых животных наблюдалось угнетение сердечного ритма.

У контрольной группы кроликов забор крови проводили без применения анестетиков, предварительно зафиксировав на станке с соблюдением правил безопасной работы, имея определенный навык обращения с этими животными.

Во всех группах животных проводили забор крови. Кровь забирали из одной из сонных артерий, расположенных по обеим сторонам трахеи, в стерильный цилиндр.

Важным критерием при выборе препарата для анестезии животных является отсутствие

Таблица. Специфическая активность иммунных сывороток животных-продуцентов, полученных с применением различных анестезирующих веществ

Table. Specific activity of immune sera of producer-animals, obtained with application of different anesthetic substances

Препарат Preparation	Титры специфических антител* Specific antibody titers			
	Сроки наблюдения Terms of observation			
	После забора крови After blood sampling	3 месяца 3 months	6 месяцев 6 months	12 месяцев 12 months
Ксила XilaVet	1:3466 (1:1600–1:6400)	1:3466 (1:1600–1:6400)	1:3466 (1:1600–1:6400)	1:3466 (1:1600–1:6400)
Ксила + Золетил 100 XilaVet + Zoletil 100	1:3600 (1:1600–1:6400)	1:3600 (1:1600–1:6400)	1:3600 (1:1600–1:6400)	1:3600 (1:1600–1:6400)
Аерран Aeranne	1:4000 (1:1600–1:6400)	1:4000 (1:1600–1:6400)	1:4000 (1:1600–1:6400)	1:4000 (1:1600–1:6400)
Контроль Control	1:3600 (1:1600–1:6400)	1:3600 (1:1600–1:6400)	1:3600 (1:1600–1:6400)	1:3600 (1:1600–1:6400)

Примечание. *Средние значения двенадцати постановок развернутой РА, в скобках — разброс значений от минимального до максимального.
Note. *Average values of 12 complete agglutination assays, in parenthesis — the range of values from minimum to maximum.

влияния на специфическую активность иммунных сывороток. Данный показатель определяли в развернутой реакции агглютинации. Активность сывороток определяли сразу после забора крови, далее изучали сохранение иммунных свойств в течение 12 месяцев с интервалом в 3, 6, и 12 месяцев. Титры антител находились в пределах от 1:1600 до 1:6400 во всех группах животных на протяжении всего срока наблюдения (таб.).

Кроликов-сосунков используют при определении вирулентности штаммов холерных вибрионов, применяемых в производстве химической вакцины холерной, таблетированной, покрытой кишечнорастворимой оболочкой, а также на этапах контрольных исследований полуфабрикатов холерной вакцины. Кроликам-сосункам 8–10-дневного возраста после разреза брюшной полости в петлю тонкого кишечника вводили суспензию исследуемых вибрионов или полуфабрикатов холерной вакцины. Операцию проводили под эфирным наркозом (контрольная группа). Несмотря на хорошие анестезирующие свойства, эфир имеет ряд недостатков и побочных действий. Продуктами разложения диэтилового эфира являются альдегиды, кетоны и пероксиды, которые достаточно токсичны и способны оказывать поражающий эффект на органы дыхания, раздражая слизистые оболочки дыхательных путей животных [1]. Помимо этого он обладает огне- и взрывоопасностью. Поэтому на сегодняшний день его применение резко ограничено. Для анестезии кроликов-сосунков апробировали хорошо показывавшую себя на взрослых кроликах комбинацию Ксилы и Золетила 100 (опытная группа). Подобрали оптимальную дозу для 100–120-граммовых жи-

вотных при внутримышечном введении. Дозу Золетила 100 вычисляли из расчета 0,25 мг/кг веса. На одного кролика-сосунка она составила 30 мкл разведенного по инструкции Золетила 100. Дозу для Ксилы вычисляли из расчета 0,15 мл/кг. На одного кролика-сосунка — 18 мкл. Кролики-сосунки погружались в наркоз в течение 1,5–2 мин, оставаясь бездвиженными на протяжении всей операции. Используемые препараты для анестезии не влияли на качество экспериментов — при введении в просвет тонкого кишечника вирулентных штаммов холерных вибрионов большинство экспериментальных животных погибало с развитием холерогенного синдрома, выражающегося в сильном растяжении толстого кишечника, наполненного прозрачной жидкостью, в контрольной и опытной группе. При заражении кроликов-сосунков полуфабрикатами холерной вакцины (холероген-анатоксином) в контрольной и опытной группе все животные выживали без изменения внутренних органов.

Обсуждение

Во время проведения ингаляционной и парентеральной анестезии у животных-доноров второй и третьей групп наблюдалось полное расслабление всех групп мышц, ослабевание рефлексов, вплоть до их полного исчезновения, понижение температуры тела было в пределах допустимой нормы, не наблюдалось угнетение сердечного ритма. Животные безболезненно погибали по окончании кровопускания. Исключение составила первая группа, в которой использовали Ксилу, как мононаркоз. Данный вид анестезии приводил к небольшому

снижению болевой чувствительности на короткое время. Также отмечалось замедление сердечного ритма, что приводило к снижению количества получаемой иммунной крови.

Таким образом, определена целесообразность применения комбинированного парентерального и ингаляционного вида анестезии при проведении тотального кровопускания у кроликов-продуцентов, за некоторым превосходством парентерального. Использование для этих целей Ксилы не рекомендуется, по ряду вышеописанных причин. Данный вид анестезии можно использовать при незначительном болевом пороге для обездвиживания животных, так как сильным обезболивающим эффектом препарат не обладает.

Применение ингаляционной анестезии с Аерраном у лабораторных животных позволяет достичь требуемой глубины наркоза и поддерживать ее до завершения всей процедуры, однако требует наличия специализированного оборудования, обученного персонала и соответствующих навыков. Парентеральное введение препаратов является более доступным. При проведении процедуры кровопускания у кроликов-продуцентов применение комбинированного парентерального наркоза с препаратами Золетил 100 и Ксила имеет ряд преимуществ: внутривенное введение не вызывает трудностей в выполнении, животное входит в наркоз мгновенно, что позволяет проводить фиксацию на станке безопасно для

сотрудников и без дополнительного стресса у животного. Кролик находится в состоянии наркоза до завершения процедуры тотального кровопускания.

Титры антител в полученных иммунных сыворотках не снижались на протяжении всего срока наблюдения и соответствовали требованиям нормативной документации.

В экспериментах на кроликах-сосунках при проведении хирургических вмешательств также показана целесообразность замены устаревшего метода анестезии с применением диэтилового эфира на комбинацию более безопасных современных препаратов Золетил 100 и Ксилы.

Изученные препараты Ксила, Золетил 100, Аерран не влияют на количество получаемой крови у животных-доноров, иммунологические качества сыворотки и готового диагностического препарата, безопасны для животных любых возрастов, что соответствует требованиям, необходимым для анестезии животных-биомоделей и животных-продуцентов в производстве иммунобиологических препаратов.

Работа выполнена в рамках научно исследовательской работы «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы», в соответствии с планом работы Комиссии по Биоэтике при «Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб».

Список литературы/References

1. Белоусов Ю.Б., Кукес В.Г., Лепяхин В.К., Петров В.И. Клиническая фармакология: национальное руководство. Руководство для врачей. 2-е изд. М.: Универсум паблишинг, 1997. 531 с. [Belousov Yu.B., Kukes V.G., Lepakhin V.K., Petrov V.I. Clinical pharmacology: a national guide. Guide for doctors. 2nd ed. Moscow: Universum Publishing, 1997. 531 p. (In Russ.)]
2. Бетшарт-Вольфенсбергер Р., Стекольников А.А., Нечаев А.Ю. Ветеринарная анестезиология. Учебное пособие. СПб.: СпецЛит, 2010. 272 с. [Butchart-Wolfensberger R., Stekolnikov A.A., Nechaev A.Yu. Veterinary anesthesiology and pain medicine. Textbook. St. Petersburg: Spetslit, 2010. 272 p. (In Russ.)]
3. Герасимов Н.М., Гиммельфарб Г.Н., Назарова Т.А. Влияние анестезии и искусственного кровообращения на метаболизм гистамина и серотонина в эксперименте // Медицинский журнал Узбекистана. 1983. № 4. С. 32–35. [Gerasimov N.M., Himmelfarb G.N., Nazarova T.A. Effect of anaesthesia and cardiopulmonary bypass on the metabolism of histamine and serotonin in the experiment. *Meditsinskiy zhurnal Uzbekistana = Uzbekistan's Medical Journal*, 1983, no. 4, pp. 32–35. (In Russ.)]
4. Гиммельфарб Г.Н. Анестезия у экспериментальных животных. Ташкент: ФАН, 1984. 144 с. [Himmelfarb G.N. Anesthesia in experimental animals. Tashkent: FAN, 1984. 144 p. (In Russ.)]
5. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Страсбург. Серия Европейских Договоров. 1986 г. № 123. 48 с. [European Convention for the protection of vertebrates for experimental and other scientific purposes. *Strasbourg*. 1986. *European Treaty Series*. No. 123. 48 p. (In Russ.)]
6. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М., 2010. 173 с. [Karkishchenko N.N., Grachev S.V. Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. Moscow, 2010. 173 p. (In Russ.)]
7. Колесов М.А. Анестезиология и реаниматология собак и кошек. М.: ООО «Аквариум-Принт», 2007. 207 с. [Kolesov M.M. Anesthesiology and resuscitation of dogs and cats. Moscow: Akvarium-Print, 2007. 207 p. (In Russ.)]
8. Лихванцев В.В. Опасности и осложнения общей анестезии. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2014. 200 с. [Likhvantsev V.V. Dangers and complications of general anesthesia. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2014. 200 p. (In Russ.)]
9. Лукьяновский В.А., Самошкин И.Б., Стекольников А.А. Местное и общее обезболивание животных: Учебное пособие. СПб.: Издательство «Лань», 2004. 208 с. [Luk'yanovskiy V.A., Samoshkin I.B., Stekolnikov A.A. Local and general anesthesia of animals: Training manual. St. Petersburg: Publishing house "Lan", 2004. 208 p. (In Russ.)]

10. Об утверждении Правил лабораторной практики (GLP): Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) № 708н. г. от 23 августа 2010 г. Москва. [On approval of laboratory practice Rules (GLP): Order of the Ministry of health and social development of the Russian Federation (Ministry of health and social development of Russia) N 708n. d. from August 23, 2010, Moscow.]
11. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (с изменениями от 2 июня 2009 г.) [Sanitary and epidemiological rules SP 1.3.2322-08 “Safety of work with microorganisms of III–IV groups of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases” (with changes of June 2, 2009)]
12. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». [Sanitary and epidemiological rules SP 1.3118-13 “Safety of work with microorganisms of I–II groups of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases”]
13. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». [Sanitary and epidemiological rules SP 2.2.1.3218-14 “ Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and content of experimental biological clinics (vivarium)”]
14. Фатеева Е.И., Чернов А.С., Телегин Г.Б. Общие принципы анестезии и аналгезии лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2014. № 2. С. 97–103. [Fateeva E.I., Chernov A.S., Telegin G.B. Guidelines for laboratory animals anesthesia and analgesia. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii = International Journal of Veterinary Medicine*, 2014, no. 2, pp. 97–103. (In Russ.)]
15. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, 1955, vol. 10, no. 2, p. 153.
16. Scfieller M.S., Told M.M., Drutimond J.C. Isoflurane, halothane and regional cerebral blood flow at various levels of PaCO₂ in rabbits. *Anesthesiology*, 1986, vol. 64, no. 5, pp. 598–604.

Авторы:

Семакова А.П., к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Германчук В.Г., д.м.н., доцент, зав. отделом экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Рогожин В.В., младший научный сотрудник отдела диагностических препаратов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Шавина Н.Ю., научный сотрудник отдела экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Овчинникова М.В., к.б.н., зав. отделом диагностических препаратов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Кириллова Т.Ю., научный сотрудник отдела диагностических препаратов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Ливанова Л.Ф., к.б.н., старший научный сотрудник отдела профилактических препаратов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Белякова Н.И., к.м.н., старший научный сотрудник отдела профилактических препаратов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Semakova A.P., PhD (Biology), Senior Research Officer of the Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Germanchuk V.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Rogozhin V.V., Junior Researcher, Department of Diagnostic Preparations, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Shavina N.Yu., Researcher, Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Ovchinnikova M.V., PhD (Biology), Head of the Department of Diagnostic Preparations, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Kirillova T.Yu., Researcher, Department of Diagnostic Preparations, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Livanova L.F., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Prophylactic Preparations, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Belyakova N.I., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Prophylactic Preparations, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.12.2018
Отправлена на доработку 29.05.2019
Принята к печати 10.06.2019

Received 09.12.2018
Revision received 29.05.2019
Accepted 10.06.2019

ОТВЕТНЫЕ МЕРЫ ПО ПРОТИВОДЕЙСТВИЮ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ПОЛИОМИЕЛИТА ВАКЦИННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ТИПА 2 В РОССИИ В 2016 г.

А.Ю. Попова¹, Е.Б. Ежлова¹, А.А. Мельникова¹, Н.С. Морозова²,
Ю.М. Михайлова², О.Е. Иванова^{3,4}, Л.И. Козловская^{3,4}, Т.П. Еремеева³,
А.П. Гмыль^{3,4}, Е.А. Короткова⁵, О.Ю. Байкова³, А.Ю. Красота^{3,5}, А.В. Иваненко⁶,
М.С. Ярмольская⁶, И.В. Ковальчук⁷, Е.Н. Романенко⁸

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

² ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

⁴ Институт трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁵ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве, Москва, Россия

⁷ Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ставропольскому краю, Ставрополь, Россия

⁸ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае, г. Ставрополь, Россия

Резюме. С момента глобального прекращения использования трехвалентной оральной полиовирусной вакцины (тОПВ) в апреле 2016 г. и перехода на использование бивалентной ОПВ, включающей полиовирусы типов 1 и 3 (так называемое «переключение»), любое выделение полиовируса типа 2 расценивается как событие чрезвычайной важности, требующее расследования, оценки риска распространения вируса и принятия ответных мер. В 2016 г. в России зарегистрировали 2 случая выделения полиовируса вакцинного происхождения типа 2 от здоровых детей. Цель исследования: на основе эпидемиологического расследования и генетических характеристик выделенных вирусов оценить риск дальнейшего распространения полиовируса вакцинного происхождения типа 2, представить меры, препятствующие дальнейшему распространению вируса среди населения. Случаи были выявлены в рамках выполнения программы надзора за полиомиелитом и синдромом острого вялого паралича в Российской Федерации. Лабораторное исследование проводили в соответствии с алгоритмом исследований, принятом в РФ, и рекомендованными стандартами ВОЗ: выделение вирусов на культурах клеток RD, L20B и Her2C, идентификация в реакции нейтрализации, внутритиповая дифференциация с помощью ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени, секвенирование фрагментов генома, кодирующих белок VP1. Оценку риска распространения полиовируса вакцинного происхождения типа 2 проводили в со-

Адрес для переписки:

Иванова Ольга Евгеньевна
108819, Россия, Москва, поселение Московский,
п. Института полиомиелита, домовладение 8, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 841-90-54. Факс: 8 (495) 549-67-60, 8 (495) 841-93-21.
E-mail: ivanova_oe@chumakovs.su

Contacts:

Olga Ye. Ivanova
108819, Russian Federation, Moscow, Moskovsky Settlement,
Institute of Poliomyelitis, home ownership 8, build. 1.
Phone: +7 (495) 841-90-54. Fax: +7 (495) 549-67-60, +7 (495) 841-93-21.
E-mail: ivanova_oe@chumakovs.su

Библиографическое описание:

Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Морозова Н.С.,
Михайлова Ю.М., Иванова О.Е., Козловская Л.И., Еремеева Т.П.,
Гмыль А.П., Короткова Е.А., Байкова О.Ю., Красота А.Ю., Иваненко А.В.,
Ярмольская М.С., Ковальчук И.В., Романенко Е.Н. Ответные меры
по противодействию распространения вируса полиомиелита вакцинного
происхождения типа 2 в России в 2016 г. // Инфекция и иммунитет. 2020.
Т. 10, № 1. С. 90–98. doi: 110.15789/2220-7619-MCS-1303

Citation:

Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Morozova N.S., Mikhailova Yu.M.,
Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I., Ereemeeva T.P., Gmyl A.P., Korotkova E.A.,
Baykova O.Yu., Krasota A.Yu., Ivanenko A.V., Yarmolskaya M.S., Kovalchuk I.V.,
Romanenko E.N. Measures counteracting 2016 spread of vaccine-derived
poliomyelitis virus type 2 in Russian Federation // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 90–98.
doi: 110.15789/2220-7619-MCS-1303

ответствии с рекомендациями ВОЗ. Установлена генетическая связь штаммов вируса, выделенных в сентябре от проживающего в Москве, прибывшего из Чеченской Республики невакцинированного мальчика (1 г.), и в декабре — от проживающей в Чеченской Республике невакцинированной девочки (1 г.), имеющей нарушения гуморального и клеточного иммунитета. Штаммы имели, соответственно, 10 и 13 нуклеотидных замен на участке генома, кодирующем белок VP1, по сравнению с вакцинным штаммом Sabin типа 2, что позволило классифицировать их как полиовирусы вакцинного происхождения. Установлено их происхождение от штамма типа 2, присутствующего в тОПВ, использованной незадолго до «переключения». Эпидемиологическое расследование выявило родственные связи и предполагаемый контакт детей в одном домовладении. Был предпринят комплекс организационных и прививочных мероприятий, а также усилен эпиднадзор за полиомиелитом в регионе. Результаты мониторинга за последующие 18 месяцев не выявили новых полиовирусов вакцинного происхождения типа 2 на территории Чеченской Республики. Оценка риска распространения полиовируса вакцинного происхождения типа 2 в регионе, стране и международного риска определила его как «низкий», не требующий применения моновалентной ОПВ типа 2. Опыт ответных мер может быть учтен для противодействия рискам в период до и после глобальной сертификации ликвидации полиомиелита.

Ключевые слова: полиомиелит, полиовирус типа 2, полиовирус вакцинного происхождения, иммунизация, оценка риска, ответные меры.

MEASURES COUNTERACTING 2016 SPREAD OF VACCINE-DERIVED POLIOMYELITIS VIRUS TYPE 2 IN RUSSIAN FEDERATION

Popova A.Yu.^a, Ezhlova E.B.^a, Melnikova A.A.^a, Morozova N.S.^b, Mikhailova Yu.M.^b, Ivanova O.E.^{c,d}, Kozlovskaya L.I.^{c,d}, Ereemeeva T.P.^c, Gmyl A.P.^{c,d}, Korotkova E.A.^e, Baykova O.Yu.^e, Krasota A.Yu.^{c,e}, Ivanenko A.V.^f, Yarmolskaya M.S.^f, Kovalchuk I.V.^g, Romanenko E.N.^h

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

^b Federal Budget Institution of Health of Rosпотребнадзор “Federal Centre of Hygiene and Epidemiology”, Moscow, Russian Federation

^c FSBSI “Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and- Biological Products of Russian Academy of Sciences”, Moscow, Russian Federation

^d Institute of Translational Medicine and Biotechnology, First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^e A.N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^f Federal Budget Institution of Health of Rosпотребнадзор “Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow”, Moscow, Russian Federation

^g Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Stavropol region, Stavropol, Russian Federation

^h Federal Budget Institution of Health of Rosпотребнадзор “Center for Hygiene and Epidemiology in the Stavropol Region”, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Since April 2016 after global cessation of using trivalent oral poliovirus vaccine (tOPV) and switch to bivalent OPV consisting of polioviruses types 1 and 3 (the “switch”), any isolation of type 2 poliovirus has been regarded as an event of extreme importance requiring investigation, risk assessment and decision making. In 2016, 2 cases of isolated vaccine-derived poliovirus type 2 from healthy children was registered in Russia. Our study was aimed at on the assessing a risk of further spread of vaccine-derived poliovirus type 2 and provide measures for preventing its further spread based on epidemiological investigation and genetic characteristics of the isolated viruses. The cases were revealed within the surveillance program for poliomyelitis and acute flaccid paralysis syndrome conducted in the Russian Federation. The laboratory investigation was carried out in accordance with the algorithm adopted in the Russian Federation and recommended by the WHO standards: virus isolation on RD, L20B and Hep2C cell cultures, identification in the neutralization reaction, intratyping differentiation by using RT-PCR in real-time mode, sequencing of the poliovirus genome fragments encoding the VP1 protein. A risk assessment for spread of vaccine-derived poliovirus type 2 was performed in accordance with the WHO recommendations. There was uncovered a genetic relationship between virus strains isolated in September and December from unvaccinated Moscow resident boy (1 year old) who arrived from the Chechen Republic and from unvaccinated girl resident of the Chechen Republic (1 year old) with impaired humoral and cellular immunity. The virus strains were found to bear 10 and 13 genomic nucleotide substitutions, respectively, at the site encoding the VP1 protein compared with the Sabin type 2 vaccine strain that allowed to classify them as vaccine-derived polioviruses. In particular, both virus strains were shown to originate from the type 2 strain presented in the tOPV used shortly before the “switch”. Epidemiological investigation revealed family ties and probable contact between both children in the same premises. A series of organizational and vaccination measures was undertaken, as well as polio surveillance was strengthened in the region. No new type 2 polioviruses of vaccine origin were detected in the territory of the Chechen Republic during 18-month monitoring follow-up. The risk assessment of spread for vaccine-derived poliovirus type 2 in a region, Russian Federation as well as cross-boundary spread identified it as “low,” requiring no use of type 2 monovalent OPV. Such experience for countermeasures may be taken into account to oppose the risks before and after the global certification for poliomyelitis eradication.

Key words: poliomyelitis, poliovirus type 2, vaccine-derived poliovirus, immunization, risk assessment, response measures.

Введение

С момента принятия в 1988 г. решения о глобальном искоренении полиомиелита [14] реализация Глобальной программы ВОЗ позволила достичь значительных успехов: четыре региона ВОЗ уже сертифицированы как свободные от полиомиелита [6–9], случаи заболевания, вызванного дикими полиовирусами (дПВ), стали единичными, и с 2013 г. они связаны только с дПВ типа 1. В 2015 г. было декларировано искоренение дПВ типа 2, последний случай заболевания которым был зарегистрирован в 1999 г. [16]. Таким образом, единственным источником вируса типа 2 оставалась трехвалентная оральная вакцина из штаммов Sabin (тОПВ). В силу биологических особенностей вакцинные штаммы Sabin способны быстро накапливать мутации и восстанавливать нейровирулентные свойства, что в случае их попадания в недостаточно иммунизированную популяцию может привести к широкой циркуляции, дальнейшей дивергенции от родительского штамма и превращению в нейровирулентные полиовирусы вакцинного происхождения (ПВВП). Согласно классификации ВОЗ, полиовирусы типа 2 (ПВ2), содержащие менее шести замен на фрагмент генома, кодирующий белок VP1, считаются Сэбин-подобными, а шесть и более замен — ПВВП2 [20]. Полагают, что с момента искоренения дПВ2 в 1999 г., все случаи полиомиелита, связанные с полиовирусами этого типа, являются результатом продолжавшегося использования тОПВ [10].

Для снижения риска, связанного с ПВ2 в составе тОПВ, ВОЗ инициировала глобальный переход на применение бивалентной ОПВ (бОПВ), включающей типы 1 и 3 [19], завершённое к 1 мая 2016 г. Предполагалось, что циркуляция ПВ2, происходящих из вакцины, использованной до «переключения», прекратится в течение 3-х месяцев, а высокий уровень коллективного иммунитета будет сдерживать формирование ПВВП2. Безопасность предложенной стратегии была основана в значительной мере на теоретических расчетах, при планировании «переключения» исходили из того, что наибольший риск возникновения циркулирующих ПВВП2 (цПВВП2) будет в течение первых 12 месяцев [13]. Учитывая то, что с момента отказа от применения тОПВ популяционный кишечный иммунитет к ПВ2 будет ослабевать, выявление ПВ2 любого происхождения (дикого, ПВВП, Сэбин-подобного) в любом образце, полученном из любого источника, рассматривается ВОЗ как «чрезвычайная ситуация для общественного здравоохранения, требующая проведения эпидемиологического расследования, оценки риска и принятия ответных мер» [21].

В Российской Федерации (РФ) переход от использования тОПВ к бОПВ состоялся 26 апреля 2016 г. Это произошло на фоне многолетнего высокого (> 95%) охвата детского населения прививками против полиомиелита и, в соответствии

с рекомендациями ВОЗ, было укреплено дополнительными иммунизационными мероприятиями в тех регионах, где это было необходимо [3]. В 2016 г. после «переключения» в РФ было зарегистрировано 4 случая выделения Сэбин-подобных полиовирусов типа 2 из сточных вод и от здоровых детей, и в двух случаях от здоровых детей были изолированы ПВВП2. В настоящем сообщении мы представляем эпидемиологическую характеристику случаев выделения ПВВП2, результаты вирусологических исследований и ответные меры, препятствовавшие дальнейшему распространению вируса среди населения.

Материалы и методы

Материалы для исследования (образцы стула и сыворотки крови) от детей с синдромом ОВП были получены в рамках проведения надзора за полиомиелитом и ОВП в соответствии с алгоритмом исследований, принятом в РФ [5], и рекомендованными стандартами ВОЗ [18]. Исследовали два образца стула, отобранных с интервалом 24 ч, два образца сыворотки крови, отобранных с интервалом 3 недели.

Здоровые дети были обследованы в рамках дополнительного надзора за циркуляцией вируса полиомиелита, принятом в РФ, в соответствии с которым все дети «групп риска» в возрасте до 5 лет, из семей мигрантов, кочующих групп населения, из семей, прибывших из эндемичных (неблагополучных) по полиомиелиту стран (территорий) и обратившиеся в медицинское учреждение, подлежат обязательному обследованию на полиовирусы [5]. От здоровых детей исследовали один образец стула.

Выделение вирусов. Вирусы выделяли на культуре клеток RD, L20B, Hep2C, рекомендованных ВОЗ для исследований по полиомиелиту, полученных из Национального Института биологических стандартов и контроля (NIBSC, Великобритания). Идентификацию энтеровирусов выполняли в реакции нейтрализации [18], внутритиповую дифференциацию полиовирусов проводили с помощью ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени [12].

Серологические исследования. Уровень нейтрализующих антител в сыворотках крови определяли в реакции нейтрализации со штаммами Sabin 3-х типов на культуре клеток Hep-2 [15].

Секвенирование фрагмента геномов полиовирусов. Выделение тотальной РНК из культуральной жидкости зараженных клеток, обратную транскрипцию, амплификацию фрагментов полиовирусного генома с помощью ПЦР, их очистку и секвенирование проводили, как описано [22]. Полногеномные последовательности изолятов были депонированы в базу данных GenBank. Сравнение последовательностей проводили с референсной последовательностью Sabin 2 GenBank ID AY184220.

Оценка популяционного иммунитета. Оценку охвата иммунизацией против полиомиелита детей в возрасте 6 месяцев — 5 лет проводили на основе выборочной оценки прививочной документации по утвержденной в РФ форме в ходе посещения медицинских организаций (поликлиник, центров иммунопрофилактики).

Исследование сточных вод

Москва. Образцы сточных вод отбирали еженедельно в ходе ежегодных плановых исследований на 4 станциях очистки сточных вод г. Москвы после механической очистки, используя сорбционный метод и последующую элюцию [17], и исследовали как описано [11]. После идентификации ПВВП2 кратность отбора проб была увеличена. Всего в 2016 г. было исследовано 516 проб сточной воды, в 2017 — 392 пробы.

Чеченская Республика (ЧР). Пробы сточных вод отбирали на очистных сооружениях после механической очистки, в лечебных учреждениях и дошкольных образовательных учреждениях (ДОУ) городов Грозный, Аргун, Гудермес, Шали и Урус-Мартан, используя сорбционный метод с последующей элюцией [17]. В 2016 г. пробы отбирали с кратностью 1 проба/месяц, в период с ноября по декабрь 2016 г. количество точек отбора было увеличено до 10, в 2017 г. точки отбора пересмотрены и увеличены до 11: 2 точки на очистных сооружениях г. Грозный, 3 точки в специализированных детских больницах г. Грозного, 2 — в ДОУ г. Грозного, по одной точке в районных больницах городов Аргун, Гудермес, Шали и Урус-Мартан.

Оценку риска распространения ПВВП2 проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [21].

Результаты

Эпидемиологическая и вирусологическая характеристика случаев

Случай 1, Москва. В сентябре 2016 г. родители мальчика А. (возраст 1 год, не вакцинирован против полиомиелита, постоянно проживает в Москве, прибыл из ЧР, где в течение лета находился на отдыхе) обратились в поликлинику по поводу респираторного заболевания. Ребенок был дополнительно обследован в ходе эпиднадзора за полиовирусом. В пробе стула от 16.09.2016 г. был выделен ПВ2, имеющий 10 нуклеотидных замен на участке генома, кодирующем белок VP1, по сравнению с вакцинным штаммом Sabin типа 2. Исследование сыворотки крови показало присутствие вируснейтрализующих антител к ПВ2 в высоком титре (1:256) и отсутствие антител к типам 1 и 3. Иммунологическое исследование не выявило у ребенка А. нарушений иммунитета. Ввиду отсутствия генетической связи с какими-либо ранее выделенными изолятами ПВ2, этот вирус был классифицирован как нПВВП2 — ПВВП типа 2 неизвестного происхождения. В ходе дальнейшего наблюдения

за вирусовыделителем А. образцы стула отбирали 1 раз в неделю. Экскреция ПВВП2 продолжалась в течение 3 месяцев.

Исследование образцов стула, отобранных в ходе эпидемиологического расследования от 25 контактных лиц, включая родителей, не вакцинированных против полиомиелита двух братьев и сестру (2011, 2013, 2015 гг. рождения), не выявило полиовирусов. Исследование сывороток непривитых контактных лиц не показало повышенных титров к ПВ2.

В 2016 г. из сточных вод Москвы было выделено 33 изолята полиовирусов (из них — 2 Сэбин-подобных полиовируса типа 2), в 2017 г. — 78 изолятов (ПВ2 не выделены). ПВВП2 не были выявлены ни в 2016 г., ни в 2017 г.

Ребенок А., его братья и сестра были вакцинированы от полиомиелита — первая доза инактивированной полиовирусной вакцины (ИПВ) была дана через месяц после выделения вируса, вторая — с интервалом 1,5 месяца, далее вакцинация и ревакцинация с помощью биОПВ в соответствии с Национальным календарем.

Случай 2. Чеченская Республика. В декабре 2016 г. здоровая девочка В. (возраст 1 год, не вакцинированная против полиомиелита, проживающая в г. Грозный) была обследована как контактный со случаем ОВП у ребенка из г. Грозный (случай ОВП был выявлен в г. Ставрополе 4 ноября 2016 г.; из образцов стула, отобранных 6–7 декабря, вирусы не были выделены). Из пробы стула, отобранной у контактного ребенка В. 8 декабря 2016 г., был выделен ПВ2, имеющий 13 нуклеотидных замен на участке генома, кодирующем белок VP1, по сравнению с вакцинным штаммом Sabin типа 2, что позволило отнести его к ПВВП. Сравнение ПВВП2, выделенных от ребенка А. (Москва) и В. (Грозный), выявило наличие у них 10 общих нуклеотидных замен на участке генома VP1. Исследование сыворотки крови ребенка В. показало отсутствие вируснейтрализующих антител ко всем трем типам полиовируса (титр < 1:8). В ходе дальнейшего наблюдения за вирусовыделителем В. не было выявлено выделения ПВВП2: пробы стула, отобранные спустя 1 и 4 месяца, были негативными.

Иммунологическое обследование ребенка В. выявило транзиторный иммунодефицит.

Было предпринято эпидемиологическое расследование, которое в результате опросов членов семей вирусовыделителей А. и В., сбора данных о передвижениях детей показало, что в августе-сентябре 2016 г. оба ребенка А. и В. находились у родственников в с. Автуры ЧР, где имел место контакт в пределах одного домовладения.

Дополнительно в течение декабря 2016 г. — января 2017 г. были обследованы 216 здоровых контактных с обоими вирусовыделителями детей в с. Автуры и г. Грозный (2016–2017 гг.), ПВВП2 выделены не были.

Генетическое сравнение вирусов

Было выполнено секвенирование полного генома изолятов ПВВП2, полученных от вирусо-выделителей А. и В. (табл. 1).

По количеству несинонимических замен времени эволюции полиовирусов, изолированных от вирусо-выделителей А. и В., от ПВ2 штамм Sabin составило более 4 месяцев. Это соответствует времени, прошедшему после прекращения применения тОПВ, и указывает на вакцинное происхождение вируса.

Основная часть мутаций в геномах исследованных изолятов представлена синонимическими заменами. Многие соответствовали ранее описанным мутациям, приводящим к деактивации вакцинного вируса, например, мутация в 5'НТР А₄₈₁→G и в белке VP1 Т₂₉₀₉→С (He₁₄₃→Thr).

Оценка степени риска распространения вируса

Для оценки степени риска использовали сведения об охвате вакцинацией в ходе плановых и дополнительных мероприятий по иммунизации, сведения, полученные при проведении быстрого популяционного исследования охвата вакцинацией детей от 6 месяцев до 5 лет по оперативным данным ЛПУ ЧР на февраль 2017 г., данные серомониторинга к полиомиелиту детей до 5 лет за предыдущие годы, а также показатели чувствительности и качества эпидемиологического надзора за ОВП и объектами окружающей среды. Результаты суммированы в таблице 2.

Учитывая надлежащее качество эпиднадзора в РФ, в том числе в ЧР (показатели соответствуют рекомендованным ВОЗ); поддержание высокого уровня охвата профилактическими прививками против полиомиелита детей, в том числе путем регулярного проведения операций подчистки, что подтверждается данными серомониторинга; локальную циркуляцию выделенных ПВВП2 (установленный контакт детей, имеющих родственные связи, в с. Автуры ЧР); полностью проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий в отношении контактных лиц, организацию полномасштабной подчищающей иммунизации; отсутствие новых фактов выделения ПВВП2 от контактных лиц и других здоровых детей при расширенном их обследовании, а также из образцов окружающей среды, риск распространения ПВВП2 в регионе, стране и международный был оценен как «низкий», не требующий применения моновалентной ОПВ типа 2.

Ответные меры

Ответные меры включали в себя комплекс организационных и прививочных мероприятий, а также меры по усилению эпидемиологического надзора за ОВП.

Организационные мероприятия

1. Группы экспертов Роспотребнадзора, Минздрава РФ и научно-исследовательских институтов страны для оказания методичес-

кой, консультативной и практической помощи были направлены в ЧР;

2. Был проведен углубленный анализ прививочности детского населения против полиомиелита в с. Автуры, в г. Грозном и в целом по ЧР, принято постановление Главного государственного санитарного врача по ЧР «О проведении подчищающей иммунизации против полиомиелита»;

3. Организовано быстрое популяционное исследование охвата прививками против полиомиелита детей (по методике, рекомендованной ВОЗ) в с. Автуры и прилегающих селах, а также в г. Грозном (результаты сопоставимы с отчетными данными);

4. В январе—марте 2017 г. в ЧР и субъектах СКФО были организованы дополнительные семинары для медицинских работников, обучение педиатров, врачей общей практики, инфекционистов, неврологов, ортопедов, эпидемиологов поликлинической сети, детских и инфекционных стационаров по клинике, диагностике и профилактике полиомиелита, энтеровирусной инфекции, заболеваний, протекающих с синдромом ОВП, по профилактике вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП).

Прививочные мероприятия

Дополнительные прививочные мероприятия в виде подчищающей иммунизации охватывали всех детей в возрасте до 5 лет, получивших менее 3 доз вакцины против полиомиелита (ИПВ или ОПВ).

1. С сентября 2016 г. на всей территории Российской Федерации организована подчищающая иммунизация против полиомиелита детей до 5 лет включительно; привито 12 780 детей, в том числе в г. Москве — 6000 детей;

2. С 23.01.2017 г. в ЧР организована подчищающая иммунизация детей до 5 лет против полиомиелита инактивированной вакциной (ИПВ); привито около 18 000 детей, в том числе в г. Грозном — свыше 2900 детей, в с. Автуры — 87 детей;

3. В феврале—марте 2017 г. в субъектах СКФО организована подчищающая иммунизация против полиомиелита детей до 5 лет; привито свыше 9300 детей;

4. В целях увеличения приверженности населения вакцинопрофилактике и снижения влияния антивакцинальных информационных кампаний в ЧР в январе—марте 2017 г. проведены круглые столы для медицинских работников и населения по вопросам вакцинопрофилактики, подготовлены лекции, видеоролики, листовки по данной тематике.

Мероприятия по усилению эпидемиологического надзора

1. Организован активный поиск пропущенных случаев ОВП, целевой показатель надзора за полио/ОВП для ЧР повышен до уровня 3 на 100 тыс. детей до 15 лет;

2. В ЧР и других субъектах СКФО пересмотрены мониторинговые точки объектов окружающей среды, увеличено их количество и кратность исследования;

3. Вирусологическое исследование образцов сточных вод из ЧР с 2017 г. проводится в вирусологической лаборатории Ставропольского Регионального Центра по надзору за полиомиелитом.

Результаты ответных мер и мониторинг ситуации в 2017 г.

В 2017 г. своевременность иммунизации детей в возрасте до 5 лет тремя дозами полиовакцины в ЧР составила 96,4%.

В 2017 г. на территории ЧР были выявлены 26 случаев ОВП, 16 из которых — у непривитых или неполностью привитых от полиомиелита детей. Окончательно подтверждено 7 случаев ОВП, показатель эпиднадзора составил 1,55/100 тыс. детей до 15 лет. При исследовании проб стула от этих случаев дПВ или ПВВП не были выделены.

В 2017 г. был реализован пересмотренный график исследования сточных вод в ЧР: количество точек отбора было увеличено до 11, пробы отбирали 1 раз в неделю, все пробы поступали для вирусологического исследования в вирусологическую лабораторию Ставропольского Регионального центра по надзору за полиомиелитом и ОВП; до этого исследование проб сточных вод проводилось в ФБУЗ «ЦГиЭ в Чеченской Республике» методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В 2016 г. из 5 точек было получено 70 проб сточной воды, в 3 из которых была детектирована РНК энтеровируса. В 2017 г. было исследовано 528 проб сточной воды, из которых было выделено 6 изолятов Sabin-подобных полиовирусов типов 1 и 3.

Взаимодействие с ВОЗ

В соответствии с Международными медико-санитарными правилами [1] ВОЗ была уведомлена о выделении ПВВП2 в Российской Федерации. Европейская региональная комиссия по сертификации полиомиелита (РКС) рассмотрела материалы по оценке ситуации и ответных мерах на выявление ПВВП2. РКС высоко оценила предпринятые ответные меры, нашла их эффективными и констатировала, что доказательств относительно дальнейшей передачи вируса нет [2].

Обсуждение

При планировании стратегии и тактики отказа от дальнейшего использования ПВ2 в ОПВ ожидалось, что в первые 1–2 года после «переключения» вероятность продолжающейся циркуляции вакцинных штаммов Sabin и риск появления ПВВП2 будет достаточно высоким. Поэтому выделение ПВ2 в период после «пере-

ключения» является чрезвычайным событием и требует оценки и незамедлительных ответных действий для предотвращения возможных негативных последствий [21]. Наиболее серьезным ответным шагом является применение моновалентной полиовирусной вакцины типа 2. Представленные результаты описывают детекцию ПВВП2, которая была выявлена спустя 5 месяцев после «переключения».

Классификация события

Молекулярно-генетический анализ выделенных в разных регионах (г. Москва и ЧР) ПВВП2 выявил их родство и происхождение от вакцинного штамма Sabin типа 2, скорее всего происходящего из тОПВ, использованной до апреля 2016 г. до «переключения» в ходе дополнительных иммунизационных мероприятий в ЧР. «Возраст» вирусов, выделенных от детей, и наличие 10 общих нуклеотидных замен на участке генома, кодирующего белок VP1, позволяет предположить, что они либо имели общий источник инфицирования в селе Автуры в конце августа — начале сентября 2016 г., либо в это же время произошла передача штамма от одного ребенка к другому. ПВВП2, выделенный от ребенка В. в декабре 2016 г., имел более длительную историю эволюции, по-видимому, в его организме. Проведенное сразу после идентификации ПВВП2 иммунологическое обследование выявило у ребенка В. транзиторное иммунодефицитное состояние, что определяет возможность длительной (около 4-х месяцев) экскреции вируса. В пробах стула, отобранных у ребенка В. спустя 1 месяц (январь 2017 г.) и 4 месяца (апрель 2017 г.) после первой детекции ПВВП2 в декабре 2016 г., вирус выделен не был. Дополнительный вирусологический мониторинг за ПВ2, проведенный в Москве и ЧР (исследование случаев ОВП, здоровых контактных, сточных вод) не выявило ПВВП2. Основываясь на критериях ВОЗ для классификации случаев детекции ПВВП2, описанная ситуация была классифицирована как «событие».

Значение дополнительных видов надзора за ПВ на завершающем этапе Глобальной программы искоренения полиомиелита

Эпидемиологический надзор за случаями ОВП (выявление и вирусологическое исследование) является основной стратегией программы. Однако информация, получаемая при исследовании только случаев ОВП, может быть недостаточной и не выявлять «молчаливую» циркуляцию дПВ или ПВВП. Заключительный этап реализации программы убедительно демонстрирует необходимость получения данных о циркулирующих ПВ из таких возможных источников как сточные воды, лица с первичными иммунодефицитами, энтеровирусный надзор. Настоящее на-

блюдение показало, что обследование здоровых детей, как контактных со случаями ОВП, так и имеющих эпидемиологически значимый анамнез (например, пребывание в эндемичных по полиомиелиту странах/регионах, отсутствие вакцинации против полиомиелита и проч.), может дать важные находки. В РФ вирусологическое обследование здоровых детей в возрасте до 5 лет, прибывших из эндемичных/неблагополучных по полиомиелиту стран, из семей мигрантов, беженцев, из числа кочующих групп населения, впервые обратившихся за медицинской помощью, было внедрено с 2002 г. после сертификации Европейского региона как «свободного от полиомиелита». Информативность этого эпидемиологического подхода была подтверждена во время вспышки полиомиелита в Таджикистане в 2010 г.: дПВ типа 1, генетически связанный с вирусами, вызвавшими вспышку, был выделен в Санкт-Петербурге от здорового ребенка, посещавшего Таджикистан [4]. В Санкт-Петербурге не было выявлено ни одного случая ОВП, вызванного дПВ типа 1 [22]. Этот факт стал основанием для проведения дополнительных мероприятий по иммунизации, направленных на предотвращение возможной циркуляции вируса и повышение эпидемиологической устойчивости.

Лабораторные исследования

Сокращение времени лабораторного исследования важно для быстрого реагирования на выделение ПВВП2 и принятия ответных мер. Современный «новый» алгоритм вирусологического лабораторного исследования материалов от случаев ОВП направлен на сокращение (до технически возможного) времени исследования. Он предусматривает выделение вируса на специфических культурах клеток (не более 14 дней) и молекулярное типирование изолята с помощью ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени, результат исследования должен быть получен не позднее 7 дней от момента выделения или поступления изолята в лабораторию. В случае необходимости проведения молекулярно-генетической характеристики изолята, секвенирование должно занять не более 7 последующих дней. Дополнительный надзор за полиовирусом в РФ выполняет 81 вирусологическая лаборатория Роспотребнадзора (6 из них являются Субнациональными лабораториями Региональных центров по полиомиелиту и включены в Глобальную лабораторную сеть ВОЗ). Молекулярное типирование и секвенирование (при необходимости) полиовирусных изолятов выполняет Национальный центр/Региональная референс-лаборатория ВОЗ в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». В описываемом случае время от момента отбора материала до получения результатов сек-

венирования составило: от ребенка А. — 23 дня, от ребенка В. — 22 дня. До 7 дней занимали процедуры по пересылке образцов. Необходимость сокращения времени транспортировки и лабораторного исследования образцов, получаемых при проведении дополнительного надзора за полиовирусом, должна быть учтена в дальнейшем для совершенствования надзора за полиовирусом в РФ.

Ответные меры

Риска распространения ПВВП2 в регионе, в РФ, международного распространения был оценен как «низкий», не требующий использования моновалентной ОПВ типа 2, однако это событие стало основанием для усиления эпидемиологического надзора за полиовирусом и проведения дополнительных мероприятий по иммунизации. Критическая оценка показателей качества надзора за ОВП, эффективности исследования сточных вод в ЧР показала, что они требуют улучшения. Показатель количества случаев ОВП в возрасте до 15 лет в ЧР был поднят до 3 на 100 тыс. детей. Исследование образцов сточных вод было перенесено в специализированную лабораторию по диагностике полиомиелита и ОВП (Региональный центр по надзору за полиомиелитом, г. Ставрополь) с изменением метода исследования с молекулярно-биологического на вирусологический, был пересмотрен график и места отбора сточных вод, что значительно повысило результативность исследований.

Хотя событие затронуло только г. Москву и ЧР, ответные меры по иммунизации в виде операций подчистки, принятые РФ, были проведены в масштабах всей страны. В целом, в рамках ответных действий в период с сентября 2016 г. по март 2017 г. было вакцинировано и ревакцинировано более 40 тыс. детей в возрасте до 5 лет. Для дополнительных мероприятий использовали трехвалентную ИПВ, руководствуясь двумя соображениями: 1) Национальный календарь профилактических прививок РФ регламентирует первые две дозы полиовирусной вакцины детям в возрасте 3 и 4,5 месяцев в виде ИПВ; 2) для ответных мер против полиовируса типа 2 рационально использовать вакцину, направленную, в том числе, против этого серотипа.

Заключение

РФ реагировала на выделение ПВВП2, основываясь на национальных документах и документах ВОЗ. Принятые меры и выводы могут быть важным уроком не только по реагированию на подобные события, но и для совершенствования систем надзора за полиовирусом, что может быть особенно важно в будущем после Глобальной сертификации ликвидации полиомиелита.

Благодарности

Выражаем благодарность Европейскому региональному бюро ВОЗ за помощь в поддержке реагентами и проведении оценки ситуации. Благодарим

сотрудников Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Чеченской Республике за помощь при проведении эпидемиологического расследования.

Список литературы/References

- ВОЗ. Международные медико-санитарные правила. 3-е издание. ВОЗ, 2016 г. [WHO. International Health regulation. Third edition. WHO, 2016.] URL: https://www.who.int/ihr/IHR_2005_ru.pdf
- ВОЗ. Отчет о 31-м совещании Европейской региональной комиссии по сертификации ликвидации полиомиелита (PKC) ВОЗ, 2017. [WHO. Report of the 31st Meeting of the European Regional Certification Commission for poliomyelitis eradication (RCC). WHO, 2017.] URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/355498/31st-RCC-report-2017-RUS.pdf?ua=1
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Фролова Н.В., Сенникова В.Г., Морозова Н.С. О качестве и результативности эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП и организации профилактических мероприятий на территории Российской Федерации // Здоровье населения и среда обитания. 2016. Т. 277, № 4. С. 31–34. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Frolova N.V., Sennikova V.G., Morozova N.S. About the quality and effectiveness of epidemiological surveillance of POLIO/AFP and the organization of preventive activities on the territory of the Russian Federation. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Population Health and Life Environment*, 2016, vol. 277, no. 4, pp. 31–34. (In Russ.)]
- Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Погребная Т.Н. Роль эпидемиологического надзора за мигрантами в системе надзора за полиомиелитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 6. С. 27–31. [Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Pogrebnaia T.N. The role of epidemiologic surveillance of migrants in the system of poliomyelitis control. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, no. 6, pp. 27–31. (In Russ.)]
- Профилактика полиомиелита: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2951-11. Москва: Роспотребнадзор, 2011. [Prevention of poliomyelitis: Sanitary rules SP 3.1.2951-11. Moscow: Rospotrebnadzor, 2011.]
- Bahl S., Kumar R., Menabde N., Thapa A., McFarland J., Swezy V., Tangermann R.H., Jafari H.S., Elsner L., Wassilak S.G.F., Kew O.M., Cochi S.L. Polio-free certification and lessons learned — South-East Asia. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2014, vol. 63, pp. 941–946.
- CDC. Certification of poliomyelitis eradication — the Americas, 1994. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 1994, vol. 43, pp. 720–722.
- CDC. Certification of poliomyelitis eradication — the Western Pacific region, October 2000. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2001, vol. 50, pp. 1–3.
- CDC. Certification of poliomyelitis eradication — European Region, June 2002. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2002, vol. 51, pp. 572–574.
- Diop O.M., Asghar H., Gavrilin E., Moeletsi N.G., Benito G.R., Paladin F., Pattamadilok S., Zhang Y., Goel A., Quddus A. Virologic monitoring of poliovirus type 2 after oral poliovirus vaccine type 2 withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2017, vol. 66, no. 20, pp. 538–542. doi: 10.15585/mmwr.mm6620a4
- Ivanova O.E., Yarmolskaya M.S., Eremeeva T.P., Babkina G.M., Baykova O.Y., Akhmadishina L.V., Krasota A.Y., Kozlovskaya L.I., Lukashev A.N.. Environmental surveillance for poliovirus and other enteroviruses: long-term experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 5: 424. doi: 10.3390/v11050424
- Kilpatrick D.R., Yang C.F., Ching K., Vincent A., Iber J., Campagnoli R., Mandelbaum M., De L., Yang S.J., Nix A., Kew O.M. Rapid group-, serotype-, and vaccine strain-specific identification of poliovirus isolates by real-time reverse transcription-PCR using degenerate primers and probes containing deoxyinosine residues. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 6, pp. 1939–1941. doi: 10.1128/JCM.00702-09
- Tebbens R.J., Pallansch M.A., Kew O.M., Cáceres V.M., Jafari H., Cochi S.L., Sutter R.W., Aylward R.B., Thompson K.M. Risks of paralytic disease due to wild or vaccine-derived poliovirus after eradication. *Risk Analysis*, 2006, vol. 26, no. 6, pp. 1471–150. doi: 10.1111/j.1539-6924.2006.00827.x
- World Health Assembly. Global Eradication of poliomyelitis by the year 2000. Resolution WHA 11.28. Geneva, WHO, 1988. URL: <https://www.who.int/ihr/polioresolution4128en.pdf>
- WHO. Manual for virological investigation of poliomyelitis. WHO/EPI/GEN/97.1. Geneva: WHO, 1997. URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_EPI_GEN_97.01.pdf
- WHO. Transmission of wild poliovirus type 2 — apparent global interruption. *Wkly Epidemiol. Res.*, 2001, vol. 76, pp. 95–97.
- WHO. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO, 2003. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67854/WHO_V-B_03.03_eng.pdf?sequence=1
- WHO. Manual for the virological investigation of polio, 4th ed. Geneva: WHO, 2004. URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.10.pdf
- WHO Global Action Plan to minimize poliovirus facility-associated risk after type-specific eradication of wild polioviruses and sequential cessation of oral polio vaccine use — GAP III. Geneva: WHO, 2015. URL: http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/12/GAPIII_2014.pdf
- WHO. Classification and reporting of vaccine-derived polioviruses (VDPV). GPEI guidelines. Aug 2016. URL: http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/09/Reporting-and-Classification-of-VDPVs_Aug2016_EN.pdf
- WHO. Standard Operating Procedures for responding to a poliovirus event or outbreak. WHO, 2019. URL: <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/sop-polio-outbreak-response-version-20193101.pdf>
- Yakovenko M.L., Gmyl A.P., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Ivanov A.P., Prostova M.A., Baykova O.Y., Isaeva O.V., Lipskaya G.Y., Shakaryan A.K., Kew O.M., Deshpande J.M., Agol V.I. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Euro Surveill.*, 2014, vol. 19, no. 7. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.7.20706

Авторы:

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

Ежлова Е.Б., к.м.н., начальник Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

Мельникова А.А., к.м.н., заместитель начальника Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

Морозова Н.С., зав. отделом обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Михайлова Ю.М., врач-эпидемиолог отдела обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Иванова О.Е., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; профессор кафедры организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Козловская Л.И., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; доцент кафедры организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Еремеева Т.П., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

Гмыль А.П., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

Короткова Е.А., к.б.н., научный сотрудник НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Байкова О.Ю., научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

Красота А.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; научный сотрудник НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Иваненко А.В., д.м.н., профессор, главный врач ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве, Москва, Россия;

Ярмольская М.С., зав. отделением вирусологии ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве, Москва, Россия;

Ковальчук И.В., к.м.н., зам. главного врача Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ставропольскому краю, г. Ставрополь, Россия;

Романенко Е.Н., руководитель вирусологической лаборатории ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

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

Ezhlova E.B., PhD (Medicine), Director of Epidemiological Surveillance Department, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Melnikova A.A., PhD (Medicine), Deputy Director, Epidemiological Surveillance Department, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Morozova N.S., Head of the Department for Support of Epidemiological Surveillance, Federal Centre of Hygiene and Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Mikhailova Yu.M., Epidemiologist of the Department for Support of Epidemiological Surveillance, Federal Centre of Hygiene and Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Ivanova O.E., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Poliomyelitis and Other Enterovirus Infections, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Organization and Production Technology of Immunobiological Preparations, Institute of Translational Medicine and Biotechnology, First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Kozlovskaya L.I., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Poliomyelitis and Other Enterovirus Infections, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Organization and Production Technology of Immunobiological Preparations, Institute of Translational Medicine and Biotechnology, First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Eremeeva T.P., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Poliomyelitis and Other Enterovirus Infections, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation;

Gmyl A.P., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Biochemistry, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation;

Korotkova E.A., PhD (Biology), Researcher, A.N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Baykova O.Yu., Researcher, Laboratory of Poliomyelitis and Other Enterovirus Infections, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation;

Krasota A.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Poliomyelitis and Other Enterovirus Infections, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation; Researcher, A.N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Ivanenko A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Medical Director, Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow, Moscow, Russian Federation;

Yarmolskaya M.S., Head of Virology Department, Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow, Moscow, Russian Federation;

Kovalchuk I.V., PhD (Medicine), Deputy Medical Director, Department of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Stavropol Region, Stavropol, Russian Federation;

Romanenko E.N., Head of the Laboratory of Virology, Center for Hygiene and Epidemiology in the Stavropol Region, Stavropol, Russian Federation.

THE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY, RESISTANCE MECHANISMS AND PHYLOGENETIC STRUCTURE OF *S. TYPHI* ISOLATED IN 2005–2018 IN THE RUSSIAN FEDERATION

S.A. Egorova^a, K.V. Kuleshov^b, L.A. Kaftyreva^{a,c}, Z.N. Matveeva^a

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

^b Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Here we present current global epidemiological and microbiological trends for typhoid fever, as well as describe antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of *S. Typhi*. The data on examining 299 *S. Typhi* isolates collected in 2005–2018 in the Russian Federation were analyzed from the Russian *S. Typhi* Reference Center. It was found that *S. Typhi* population consisted of the isolates with different resistance phenotypes and mechanisms as well as genetic heterogeneity. Moreover, antimicrobial susceptibility was detected in as low as 10.4% *S. Typhi* strains, whereas 89.6% isolates showed fluoroquinolone resistance (including 7.3% high-level resistance) and 3.0% — multidrug resistance to ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline and fluoroquinolones. All strains preserved susceptibility to extended-spectrum cephalosporins and azithromycin. Fluoroquinolone low-level resistance in *S. Typhi* was due to single nucleotide substitutions in the *gyrA*: Asp87Asn (78.7%) Ser83Tyr (5.0%) and Ser83Phe (3.2%). In addition, a plasmid-mediated low-level fluoroquinolone resistance (*qnrS*) was found in one isolate. In contrast, a fluoroquinolone high-level resistance in *S. Typhi* was due to accumulation of three single nucleotide substitutions in the genes *gyrA* (Asp87Asn+Ser83Phe) and *parC* (Ser80Ile). In multidrug resistant *S. Typhi* isolates, pHCM1 plasmids of incompatibility group IncHI1B(R27) (consisted of *bla*_{TEM-1}, *catA1*, *dfrA7* and *tetB*) and single nucleotide substitutions Ser83Tyr or Asp87Asn in gene *gyrA* were detected. The data of phylogenetic reconstruction based on the analysis of core single-nucleotide variations among examined and previously sequenced *S. Typhi* genomes, demonstrated that more than 80.0% of *S. Typhi* isolated in Russia were referred to the Asian genotype as they belonged to subclade 4.3.1 (by Wong et al.) or dominant H58 clade (H58 haplotype by Roumagnac et al.). More than 60.0% isolates in this dominant phylogenetic group possessed a fluoroquinolone low-level resistance due to *gyrA* Asp87Asn. Less than 20.0% of *S. Typhi* strains isolated in Russia phylogenetically belonged to the subclades other than 4.3.1 (non-H58) and differed from the major *S. Typhi* population by lacked antibiotic resistance or exerted fluoroquinolone resistance due to *gyrA* Ser83Phe. The study data allowed to expand our understanding on genetic diversity in *S. Typhi* strains isolated recently and pinpoint features of phylogenetic structure for *S. Typhi* population in the Russian Federation.

Key words: typhoid fever, *S. Typhi*, antimicrobial resistance, SNV, fluoroquinolones, nucleotide substitutions.

Адрес для переписки:

Егорова Светлана Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-48-83. Факс: 8 (812) 232-92-17.
E-mail: egorova72@mail.ru

Contacts:

Svetlana A. Egorova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-48-83. Fax: +7 (812) 232-92-17.
E-mail: egorova72@mail.ru

Библиографическое описание:

Егорова С.А., Кулешов К.В., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н.
Чувствительность к антибиотикам, механизмы резистентности
и филогенетическая структура популяции *S. Typhi*, выделенных
в 2005–2018 гг. в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет.
2020. Т. 10, № 1. С. 99–110. doi: 10.15789/2220-7619-ASM-1171

Citation:

Egorova S.A., Kuleshov K.V., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N. The antimicrobial
susceptibility, resistance mechanisms and phylogenetic structure of *S. Typhi*
isolated in 2005–2018 in the Russian Federation // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1,
pp. 99–110. doi: 10.15789/2220-7619-ASM-1171

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ *S. Typhi*, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2005–2018 гг. В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Егорова С.А.¹, Кулешов К.В.², Кафтырева Л.А.^{1,3}, Матвеева З.Н.¹

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

² ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В статье представлены современные глобальные эпидемиологические и микробиологические тенденции брюшного тифа, описаны чувствительность и механизмы резистентности к антибиотикам. Приведены результаты исследования 299 штаммов *S. Typhi*, выделенных в 2005–2018 гг. в Российской Федерации, из коллекции российского референс-центра по мониторингу возбудителя брюшного тифа. Популяция штаммов *S. Typhi*, характеризовалась различными фенотипами и механизмами резистентности к антибиотикам и генетической неоднородностью. Чувствительными к антибиотикам были 10,4% штаммов, 89,6% штаммов характеризовались устойчивостью к фторхинолонам (7,3% штаммов — устойчивостью высокого уровня), 3,0% — множественной устойчивостью к ампициллину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, тетрациклину и фторхинолонам. Все штаммы сохраняли чувствительность к цефалоспорином расширенного спектра и азитромицину. Устойчивость низкого уровня к фторхинолонам у штаммов *S. Typhi* обусловлена однонуклеотидными заменами в гене *gyrA*: Asp87Asn (78,7%), Ser83Tyr (5,0%) и Ser83Phe (3,2%). У одного штамма выявлена плазмидопосредованная устойчивость низкого уровня к фторхинолонам (ген *qnrS*). Устойчивость высокого уровня к фторхинолонам обусловлена сочетанием трех однонуклеотидных замен: в гене *gyrA* (Asp87Asn+Ser83Phe) и *parC* (Ser80Ile). У штаммов с множественной устойчивостью выявлены плазмиды рНСМ1 группы несовместимости IncHI1B(R27), которые включали гены *bla*_{TEM-1}, *catA1*, *dfrA7* и *tetB*, и однонуклеотидные замены Ser83Tyr и Asp87Asn в гене *gyrA*. По результатам филогенетической реконструкции, проведенной на основе анализа коровых однонуклеотидных вариаций среди исследуемых и ранее секвенированных геномов *S. Typhi* из разных регионов мира (порядка 1700 штаммов), показано, что более 80,0% российских штаммов относились к азиатскому генотипу, поскольку принадлежали к филогенетической линии гаплотипа H58 (Roumagnac et al.) или субкладе 4.3.1 (Wong et al.). Более, чем 60,0% штаммов этого генотипа были идентичны по фенотипу и механизму резистентности: устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленная мутацией *gyrA* Asp87Asn. Менее 20,0% исследуемых штаммов филогенетически относились к другим субкладам (не 4.3.1) и отличались от основной популяции возбудителя брюшного тифа отсутствием резистентности к антибиотикам, либо имели резистентность к хинолонам, обусловленную однонуклеотидной заменой *gyrA* Ser83Phe. Результаты исследования позволили расширить представление о генетическом разнообразии штаммов *S. Typhi*, выделенных за последние годы на территории РФ, и определить особенности популяционной структуры возбудителя брюшного тифа.

Ключевые слова: брюшной тиф, *S. Typhi*, устойчивость к антибиотикам, SNP, фторхинолоны, нуклеотидные замены.

Introduction

Typhoid fever is registered worldwide and has not yet been eradicated globally. According to the most recent WHO estimates, between 11 and 21 million cases and 128,000 to 161,000 typhoid-related deaths occur annually worldwide (<https://www.who.int/immunization/diseases/typhoid/en>). The real typhoid fever incidence is difficult to assess due to the lack of reliable laboratory diagnostic in typhoid-endemic countries (especially in Africa), and among infants and young children. Some population-based studies showed a wide variation in the typhoid fever incidence (from single cases to > 500 per 100,000 per year), both at the global level and within individual countries [10, 25].

Typhoid fever continues to be a serious public health problem in the regions of sub-Saharan Africa, South and South-East Asia, and Oceania with the lowest population coverage with safety water and

good sanitation facilities. In these countries the urbanization, which leads to overcrowding, increases the probability of outbreaks. Also the serious problem is that typhoid fever is common among children under 5 years of age in many endemic countries. The lack of appropriate laboratory facilities and poor access to the hospital-level healthcare are the important reasons of the delaying in effective antimicrobial treatment, the increasing the frequency of complications, deaths and chronic carriers. In economy developed countries, the typhoid fever is usually registered in tourists returning from typhoid endemic countries (India, Pakistan, Nepal, Bangladesh, Indonesia, etc.). Often typhoid fever is imported by the labour migrants from the endemic countries.

In 1972 epidemic *S. Typhi* isolates resistant to first-line antibiotics (ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim/sulfamethoxazole) were isolated (so called “multi drug resistant *S. Typhi*”, MDRST) [29]. The number of MDRST has increased rapidly

in South Asia and South Africa. Thus, in Vietnam, the first MDRST was isolated in 1993, but in 2005 almost 90.0% of *S. Typhi* isolated in this country were MDRST, so these antibiotics have lost their importance in the treatment of typhoid fever [45]. In the UK, MDRST ranged from 20.0 to 40.0% in the 1990s, and about 90.0% of MDRST cases were associated with travel to Pakistan and India [45]. Fluoroquinolone (ciprofloxacin and ofloxacin) has become the drug of choice following the emergence of MDRST [14], but the spread of isolates with decreased susceptibility to ciprofloxacin has limited their effectiveness. In recent years, the proportion of fluoroquinolone resistant *S. Typhi* with low-level resistance (MIC of ciprofloxacin 0.12–0.5 mg/l) reaches 70.0–80.0%. The uncontrolled access to fluoroquinolones has led to the rapid spread of resistant *S. Typhi* in South-East Asia. Several global studies conducted in 1995–2012 in eight Asian countries, cover about 80.0% of world's typhoid fever cases (India, Vietnam, Nepal, Bangladesh, Cambodia, Laos, Thailand, China), showed that the MDRST proportion decreased from 16.0 to 37.0%. In Vietnam and India the fluoroquinolone low-level resistant *S. Typhi* increased to 97.0%, in other countries — to 65.0%; moreover, there was a dramatically rapid increasing in such resistance from 4.0 to 97.0% [9, 19].

The gradual decline of MDRST proportion in typhoid-endemic Asian countries in recent years is likely due to the change in the antibiotic treatment of typhoid fever. Antibiotic change has decreased the selective pressure and caused the elimination of plasmids carrying the multidrug resistance genes. At the same time, MDRST proportion is high in the countries of West Africa: from 20.0 to 60.0% of *S. Typhi* isolated in Nigeria, Cameroon, Guinea in 2000–2013 were multidrug resistant due to plasmids IncHI1, but quinolone resistance due to *gyrA* mutations was rare found [7, 22].

In developed countries with mainly imported cases of the typhoid fever, the situation with antimicrobial resistance in *S. Typhi* repeats the situation in the “source” endemic countries. According to CDC in the USA the proportion of resistant *S. Typhi* increased from 25.6% (in 2002) to 75.5% (in 2014) and the level of quinolone resistant *S. Typhi* is constantly growing (from 23.6% in 2002 to 77.6% in 2014), MDRST was about 12.0% [8]. The travel persons had the highest chance to be infected by resistant *S. Typhi* in the Indian subcontinent countries: 65.0% of patients in USA and 32.0% in France infected in these countries had a quinolone resistant *S. Typhi* [8, 45].

In 2003 the World Health Organization published the guidelines that recommended azithromycin, ceftriaxone, or cefixime for the treatment of quinolone-resistant *S. Typhi* and *S. Paratyphi A* infections [48]. Extended-spectrum cephalosporins (ceftriaxone and cefixime) are commonly used for typhoid fever in children and caused by MDRST or fluoroquinolone

resistant *S. Typhi*. Since 2007 in Asia (India, Kuwait, Nigeria, Korea, Pakistan, Bangladesh) and Africa (Nigeria, Congo) *S. Typhi* producing both ESBL (mainly CTX-M15 and SHV-12) and AmpC cephalosporinases (CMY-2 and ACC-1) have been isolated. Single isolates of *S. Typhi* isolated in European countries (Germany, Norway, the Netherlands, Spain) and the United States were imported from Asia [3–6, 16–18, 20, 34–40].

So, *S. Typhi* has acquired the resistance to almost all antibiotics used to the treatment of typhoid fever at the different time. This pathogen has adapted to the antimicrobial selective pressure by the various molecular mechanisms: the emergence of chromosomal mutations or the acquisition of mobile genetic elements containing resistance genes. The widespread of *S. Typhi* resistant to the fluoroquinolones and the emergence of isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins mean that the choice of antibiotics for the treatment of typhoid fever is limited.

The classical subtyping techniques used by public health laboratories such as phage typing or pulsed-field gel electrophoresis are phylogenetically naive (don't reflect phylogenetic relatedness among strains) and have limited discriminatory power to support an objective picture of the diversity of strains in global scale and evolution of this pathogen. Whole genome analysis showed that the global *S. Typhi* population is rather young, highly clonal and originated from a common ancestor existed so recently that multiple mutations have not yet accumulated (15,000–150,000 years ago) [2, 21, 24]. According to Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) more than 95.0% of the *S. Typhi* studied by MLST of 7 housekeeping genes belong to two genetically closely related sequence types ST1 and ST2.

To evaluate the phylogenetic relatedness in the highly clonal pathogen population, the genotyping method, based on the detection in the compared genomes of the whole range of core single-nucleotide variations (SNV) located both in coding and non-coding genome regions, is commonly used. The principle of SNV-typing of *S. Typhi* isolates is currently widely used to evaluate the pathogen population structure and to determine the relation between single or group strains.

In 2015, Wong et al. [46] carried out a large-scale study using a whole genome analysis of 1832 isolates of *S. Typhi* isolated in 63 countries. Phylogenetic analysis showed that most isolates belonged to the recently defined haplotype H58 [41, 46]. All these isolates contained the nucleotide substitution C2348902T in the position relative to the reference genome *S. Typhi* CT18. Moreover, the strains of H58 haplotype formed the two main sublineages I and II. Taking into account the time and place of *S. Typhi* isolation, their phylogenetic position and early facts of the intercontinental transmission, it was suggested that the earliest reservoir for H58 strains was the re-

gion of South Asia with further spread to South-East and West Asia, East Africa (Kenya, Tanzania, Malawi) and South Africa [41, 46].

Wong et al. [47] proposed an algorithm for the rapid phylogenetic classification of the strain genome. This analysis is based on the detection of specific nucleotide polymorphisms causing the branch divergence on a pre-reconstructed phylogenetic tree [46]. In practice, the researcher analyzes only one isolate genomic data and understands its phylogenetic position on the global phylogenetic tree. According to this analysis, the global *S. Typhi* population is divided into 4 primary cluster (1–4), which in turn are divided into 16 clades and 49 subclade [47]. Although this analysis does not allow to establish the exact phylogenetic position of the isolate, but allows to determine the geographical region of the isolate origin.

The Russian Federation isn't typhoid-endemic country, and according to the official registration the incidence is low (0.03–0.1 per 100,000 per year) and sporadic. In the last ten years (2009–2018) in Russia 320 cases of typhoid fever were registered as sporadic cases, group cases (2–4 persons) and several outbreaks (15–20 persons). The occurrence of outbreaks was possible due to hygiene and sanitation violations in the canteen (where the Asian cook was a *S. Typhi* carrier) and in the hostel for the Asian labour migrants. Annually the typhoid fever cases are imported from endemic areas (Central, South and South-East Asia) by the Russians tourists, labour migrants and foreign students returned to Russian universities after the holiday in Asia home countries. In general, in 2008–2018 the typhoid fever was imported to Russia from 13 countries: Tajikistan, Uzbekistan, Kyrgyzstan, Azerbaijan, Abkhazia, Bangladesh, Cambodia, India, Pakistan, Nepal, Egypt, Madagascar and the United Arab Emirates.

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility and phylogenetic structure of the *S. Typhi* population isolated in Russia in 2005–2018.

Materials and methods

The study included 299 isolates from the collection of the Russian *S. Typhi* Reference Center isolated in 21 administrative regions of the Russian Federation in 2005–2018: St. Petersburg and Leningrad region, Moscow, Ivanovo, Ryazan, Arkhangelsk, Tula, Smolensk, Voronezh, Orel, Novgorod, Ulyanovsk, Irkutsk, Kaliningrad, Kemerovo, Tomsk, Kirov, Krasnoyarsk, Khabarovsk, Khanty-Mansi and in the Jewish Autonomous region.

The set of antimicrobials for testing was selected in order to reflect the importance for treatment and surveillance: the drugs of choice or alternative for the treatment of typhoid fever (ciprofloxacin, azithromycin, cefotaxime, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole); the indicators of clinically

important resistance mechanisms (amoxicillin/clavulanic acid, ceftazidime, nalidixic acid, pefloxacin); the antibiotics critical important for the public health that may be needed for future treatment of MDRST (meropenem); the additional epidemiological markers for outbreak investigation (aminoglycosides, tetracycline).

Antimicrobial susceptibility testing was made by disk diffusion method and E-test with Mueller–Hinton agar and discs of Oxoid and E-tests of bioMérieux, according to EUCAST (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf) and Russian clinical guidelines “Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms”, version 2015 (<http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>). The fluoroquinolones were tested by disk diffusion method (with nalidixic acid and pefloxacin) and E-test (MIC of ciprofloxacin). We used the following breakpoints for the category “resistant” to fluoroquinolones: inhibition zone of pefloxacin < 24 mm, nalidixic acid < 16 mm, and MIC of ciprofloxacin > 0.06 mg/l. Susceptibility of *S. Typhi* to azithromycin was determined by E-test, the isolates with MIC ≤ 16.0 mg/l were interpreted as “susceptible”.

Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance (genes *qnr* S, A, B and *aac(6′)-Ib-cr*) was detected in 299 *S. Typhi* isolates by PCR according to previously published protocols [32, 38].

Whole genome sequencing of 117 *S. Typhi* was performed on the device MiSeq (Illumina, USA) with MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles. Genomic DNA was isolated by the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany). Genome libraries were prepared using MiSeq Nextera XT (Illumina, USA). Genome assembly and analysis was performed using CLC Genomics Workbench 8.0 (Qiagen, Germany). Detection of chromosomal mutations (in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes), acquired resistance genes and plasmids was made using the online-services ResFinder and PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk>).

To reconstruct the global phylogenetic tree, we analyzed a set of 1683 *S. Typhi* isolates, which included both Russian isolates and isolates sequenced in previous studies. Thus, the set of *S. Typhi* isolates under our investigation was characterized by the wide isolation time period (from 1905 to 2013) and broad geographical origin (63 countries, 6 continents (Asia, Africa, North and South America, Europe, Australia and Oceania)).

The detection of orthologous SNV was performed using the previously developed algorithm of data analysis [27]. The nucleotide sequence of *S. Typhi* CT18 strain (NCBI acc. AL513382) was used as a reference genome. The resulting matrix of orthologous SNV was used for phylogenetic reconstruction in RAxML software, the model GTR+I was used as

a model of nucleotide substitutions. Bootstrap analysis was carried out with the number of repetitions 1000. The phylogenetic tree visualization was carried out in the program Figtree v1.3.1.

Additionally, Russian *S. Typhi* isolates were analyzed by Genotyphi software (<https://github.com/katholt/genotyphi>) according to the author's instructions.

Results

All *S. Typhi* isolates gave the good bacterial grows and formed the typical colonies on selective and non-selective Russian and foreign media for Enterobacterales represented in the Russian market. *S. Typhi* had typical biochemical activities and serological formula (9, 12, Vi: d:-). All isolates had a well-developed Vi-antigen; moreover, 36 isolates (12.0%) had a highly developed Vi-antigen, which did not allow to identify the O-group. All isolates were well lysed by liquid therapeutic bacteriophage for Salmonella of groups A, B, C, D, E (produced by Microgen, Russian Federation).

Antimicrobial susceptibility of *S. Typhi*

The *S. Typhi* population was represented by both antimicrobial susceptible (31 isolates, 10.4%) and resistant (268 isolates, 89.6%) isolates. The proportion of isolates resistant to fluoroquinolone was 89.6%, to ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sul-

fametroxazole and tetracycline — by 2.7%. *S. Typhi* resistant to extended-spectrum cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides and azithromycin were not detected (tabl. 1).

So, in our study 89.6% of *S. Typhi* isolates were found to be resistant to fluoroquinolones — the drugs of choice for the treatment of typhoid fever. 82.3% of *S. Typhi* had the low-level resistance with MIC of ciprofloxacin 0.125–0.5 mg/l, 7.3% of isolates — the high-level resistance with MIC 8.0–32.0 mg/l. All *S. Typhi* were susceptible to azithromycin with MIC₉₀ 8.0 mg/l, seven isolates had “critical” MIC 16.0 mg/l.

The *S. Typhi* population divided into 3 resistance phenotypes: susceptible to all tested antibiotics (31 isolates, 10.4%), resistant only to fluoroquinolones (260 isolates, 86.9%) and multidrug resistant, MDRST (to fluoroquinolones, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline) (8 isolates, 2.7%).

Susceptible isolates of *S. Typhi* were isolated in 9 regions of the Russian Federation: St. Petersburg (2005–2012, 2014), Leningrad region (2009, 2014), Moscow (2011), Irkutsk (2005, 2012), Orel (2009), Voronezh (2015), Novgorod (2009), Ulyanovsk (2010) and Kemerovo (2012). Fluoroquinolone resistant *S. Typhi* were isolated annually in all regions of Russia.

Eight *S. Typhi* had multidrug resistance: to fluoroquinolones (low-level resistance, MIC ciproflox-

Table 1. Antimicrobial susceptibility of *S. Typhi* strains isolated in Russia in 2005–2018 (n = 299)

Antimicrobials		Category (S – susceptible, R – resistant)	Number of isolates		
			n	%	95% CI
Beta-lactams	Aminopenicillines	S	291	97,3	94,8–98,6
		R	8	2,7	1,4–5,2
	Extended spectrum cephalosporines	S	299	100	98,7–100
		R	0	0	0–1,3
	Carbapenems	S	299	100	98,7–100
		R	0	0	0–1,3
Fluoroquinolones	S	31	10,4	7,4–14,3	
	R	268	89,6	85,7–92,6	
	low-level resistant*	246	82,3	77,5–86,2	
	high-level resistant**	22	7,3	4,9–10,9	
Aminoglycosides (genta-, tobra-, amikacin)	S	299	100	98,7–100	
	R	0	0	0–1,3	
Chloramphenicol	S	291	97,3	94,8–98,6	
	R	8	2,7	1,4–5,2	
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	S	291	97,3	94,8–98,6	
	R	8	2,7	1,4–5,2	
Tetracycline	S	290	97,0	98,1–99,9	
	R	9	3,0	1,6–5,6	
Azithromycin	S	299	100	98,7–100	
	MIC ₅₀ – 4,0 mg/l MIC ₉₀ – 8,0 mg/l				
	R	0	0	0–1,4	

Note. * MIC of ciprofloxacin 0,125–0,5 mg/l; ** MIC of ciprofloxacin 4,0–32,0 mg/l.

cin 0.12–0.5 mg/l), aminopenicillins (MIC > 256.0 mg/l), chloramphenicol (MIC > 256.0 mg/l), tetracycline (MIC 64.0–128.0 mg/l) and trimethoprim/sulfamethoxazole (MIC > 32.0 mg/l). Six MDRST were isolated in 2005 and 2006 in St. Petersburg, Leningrad and Irkutsk oblast. During next six years (from 2007 to 2012) MDRST were not detected in Russia. In 2013 and 2015 two MDRST were isolated in St. Petersburg. The emergence of MDRST in Russia was associated with the import by labor migrants from Central Asia (Tajikistan and Uzbekistan).

Molecular resistance mechanisms of *S. Typhi*

Fluoroquinolone resistance molecular mechanisms of 117 *S. Typhi* were detected by FesFinder. Resistance phenotypes and molecular mechanisms of *S. Typhi* with different levels of fluoroquinolone resistance are presented in tabl. 2. No mutations in chromosomal genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* or acquired resistance plasmid genes were found in susceptible *S. Typhi*. The group of fluoroquinolone resistant *S. Typhi* (94 isolates) had different mutations in *gyrA* and *parC*. Isolates with low-level resistance had a single nucleotide substitution in *gyrA*, the most frequent in codon 83 of *gyrA* Asp87Asn (78.7%). *S. Typhi* with these phenotype and mutation were isolated annually in all region of Russia. Three *S. Typhi* with single nucleotide substitution in *gyrA* Ser83Phe were isolated in St. Petersburg and Arkhangelsk (according epidemiological data *S. Typhi* from Arkhangelsk was imported to Russia from India in 2012). In five *S. Typhi* the substitution in *gyrA* Ser83Tyr was detected: one isolate with additional multidrug resistance was isolated in St. Petersburg in 2006, other four *S. Typhi* were isolated in 2011 in St. Petersburg, Irkutsk, Tula and Arkhangelsk. So, the identical fluoroquinolone resistance phenotype (low-level resistance) in *S. Typhi* was caused by three different single nucleotide substitutions in *gyrA*.

All studied *S. Typhi* with fluoroquinolone high-level resistance had three single nucleotide substitu-

tions simultaneously: in *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) and *parC* (Ser80Ile). *S. Typhi* isolates with fluoroquinolone high-level resistance were isolated in 2005–2018 in seven regions of Russia: St. Petersburg (2007, 2013), Kaliningrad (2011, 2012), Smolensk (2012), Voronezh (2014), Kirov (2015), Arkhangelsk (2015) and Khanty-Mansiysk (2016). In all cases, the patients were infected travelling to India (tourists, Indian students of Russian universities).

Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance (*qnrS*) was found in one *S. Typhi* isolate with “paradox” phenotype of quinolones resistance: MIC of ciprofloxacin 0.25 mg/l (low-level resistance), but susceptibility to nalidixic acid (MIC 4.0 mg/l), which is common for plasmid-mediated fluoroquinolone resistance.

Multidrug resistance in 8 *S. Typhi* isolates was mediated by the plasmid pHCM1 (incompatibility group IncHI1B(R27)) PST6, which included genes *bla*_{TEM-1}, *catA1*, *dfrA7* and *tetB*. Fluoroquinolone low-level resistance in these isolates was associated with single nucleotide substitutions in *gyrA* Ser83Tyr or Asp87Asn.

Phylogenetic structure of *S. Typhi* population isolated in Russia in 2005–2018

We constructed the global *S. Typhi* phylogeny by SNV analysis of 1683 isolates of *S. Typhi* including 92 *S. Typhi* isolated in the Russian Federation with different antimicrobial resistance phenotypes and mechanisms.

In the global phylogenetic tree Russian *S. Typhi* isolates were clustered into several phylogenetic groups. The most of them (82.6%) belonged to the dominant H58 haplotype of *S. Typhi* (fig., tabl. 3). The phylogenetic lineage of H58 was heterogeneous: *S. Typhi* isolates were clustered into three phylogenetic groups (designated as G1, G2 and G3), and five isolates had individual genotypes (designated as S1–S5). 60.0% isolates of H58 belonged to the group G3 and had identical resistance phenotype (fluo-

Table 2. Phenotypes and molecular mechanisms of quinolones resistance in *S. Typhi* strains isolated in Russia in 2005–2018 (n = 117)

Phenotypes	MIC, mg/l		Single nucleotide substitutions (amino acid substitutions) in <i>gyrA</i> and <i>parC</i>	Plasmid-mediated resistance	Number of strains	
	Nalidixic acid	Ciprofloxacin			n	% in resistant strains studied (n = 94)
Susceptible n = 23	0,75–4,0	0,004–0,023	Not detected	Not detected	23	–
Fluoroquinolone low-level resistance n = 83	24 – ≥ 256,0	0,094–0,25	<i>gyrA</i> (Asp87Asn)	Not detected	74	78,7
	≥ 256,0	0,19–0,25	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr)	Not detected	5	5,3
	≥ 256,0	0,19	<i>gyrA</i> (Ser83Phe)	Not detected	3	3,2
	4,0	0,25	Not detected	<i>qnrS1</i>	1	1,1
Fluoroquinolone high-level resistance n = 11	≥ 256,0	8,0 – ≥ 32,0	<i>gyrA</i> (Ser83Phe+ Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile)	Not detected	11	11,7

Amino acids: Ser – Serine, Asp – Aspartic acid, Asn – Asparagine, Phe – Phenylalanine, Ile – Isoleucine, Tyr – Tyrosine.

roquinolone low-level resistance) and resistance mechanism (single nucleotide substitution in *gyrA* Asp87Asn).

The phylogenetic group G1 (11.2%) included *S. Typhi* with fluoroquinolone high-level resistance mediated by three single nucleotide substitutions: *gyrA* (Ser83Phe+Asp87Asn) + *parC* Ser80Ile. The *S. Typhi* isolates of the phylogenetic group G2 (7.8%) had the identical resistance mechanism (fluoroquinolone low-level resistance due to *gyrA* Asp87Asn), but two isolates also had additional multidrug resistance associated with the plasmid IncHI1B(R27). Five *S. Typhi* H58 isolates with individual genotypes (S1-S5) were susceptible to antibiotics or had fluoroquinolone low-level resistance due to *gyrA* Ser83Tyr — the single nucleotide substitution, which was not found in other phylogenetic groups.

The described phylogenetic groups of H58 clade included *S. Typhi* isolated in different regions of Russian during all years under study. Epidemiological data was agreed with phylogenetic analysis as well as antimicrobial susceptibility. The isolates from the same outbreaks (St. Petersburg 2006, Moscow 2013) or group cases (Kaliningrad 2012, Irkutsk 2016) were clustered together in one phylogenetic group and had identical antimicrobial resistance patterns due to identical single nucleotide substitutions.

In groups of non-H58 *S. Typhi* almost all isolates were susceptible to antibiotics except one isolate with fluoroquinolone low-level resistance due to the single

nucleotide substitution in *gyrA* Ser83Phe, detected in other phylogenetic groups only in combinations with other single nucleotide substitution. Some isolates were clustered into phylogenetic groups (designated as G4-G6), others had individual genotypes (fig., tabl. 3).

Additional analysis of sequenced *S. Typhi* genomes by Genotyphi software showed that Russian *S. Typhi* population was represented by the isolates of all four primary clusters, but mainly — by the cluster 4 (83.7%) (tabl. 3). Within cluster 4, the majority of isolates (82.6%) belonged to subclade 4.3.1. According to Wong et al. [47] progenitor *S. Typhi* isolates of this subclade are originated from the countries in South-East and South Asia. It should be noted that all isolates of the subclade 4.3.1. belonged to the phylogenetic lineage of H58 haplotype defined by the global phylogeny. At the same time, Russian isolates of the subclade 4.3.1. were further clustered in two genetic clusters. The cluster 4.3.1.1 (68.5%) mainly included the isolates with fluoroquinolone low-level resistance due to *gyrA* Asp87Asn, and the cluster 4.3.1.2 (14.1%) — the isolates with fluoroquinolone low-level resistance due to non-common nucleotide substitution in *gyrA* Ser83Tyr, and the isolates with high-level resistance due to three single nucleotide substitutions: *gyrA* (Ser83Phe+Asp87Asn) and *parC* (Ser80Ile). Furthermore, within cluster 4, one antimicrobial susceptible *S. Typhi* isolate (Voronezh, 2015) belonged to subclade 4.1.1 and was probably of African origin.

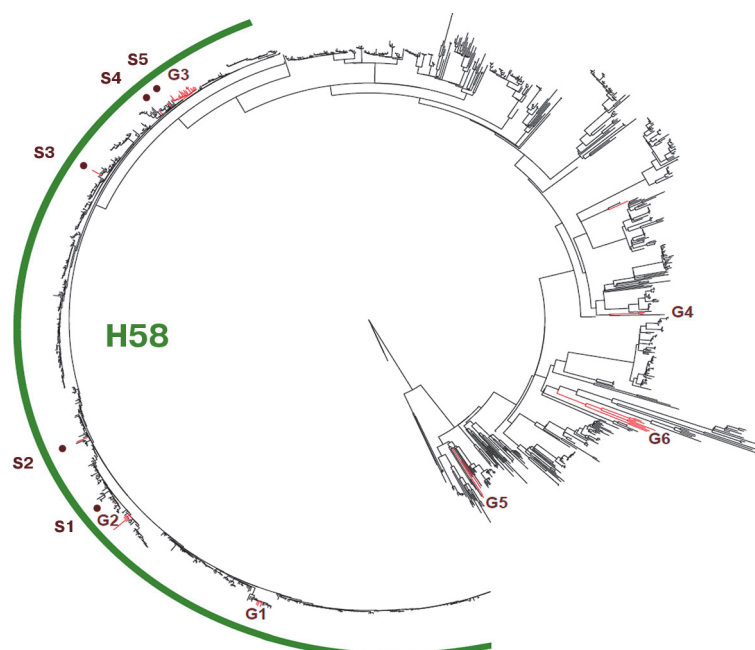


Figure. The global phylogenetic tree constructed on the basis of the identified orthologous SNV in 1683 *S. Typhi* genomes

The tree was reconstructed by the maximum likelihood method implemented in the RAxML. The phylogenetic lineage related to haplotype H58 is highlighted in green. The tree branches with Russian *S. Typhi* isolates are marked in red. If several Russian *S. Typhi* isolates were clustered together, they were designated as a phylogroup “G”, if individually — as “S”. Description of phylogroup of Russian isolates given in Table 3.

Table 3. Characteristics of *S. Typhi* strains isolated in Russia in 2005–2018 by the resistance mechanisms and phylogenetic analysis (n = 92)

Phylogroups		Resistance genotypes	Number of strains	Place and year of isolation	Geographic origin of isolates in reference set (microreact.org/project/styphi)
Wong et al. [47]	Global phylogeny				
1.2.1	nonH58_G6	WT	8	St. Petersburg 2009 and 2011; Leningrad region 2009; Moscow 2011; Tomsk 2015; Kyrgyzstan 2010; Kazakhstan 2012	South-East Asia (100%) — Vietnam
2.0.2	nonH58	<i>gyrA</i> (Ser83Phe)	1	St. Petersburg 2017	North America (50%) — Mexico North Africa (50%) — Algeria, Tunisia
2.3.2	nonH58_G5	WT	2	Kemerovo 2012	West Africa (33%) — Nigeria, Mali South America (27%) — Argentina South-East Asia (20%) — Vietnam, Thailand North America (13%) — Mexico West Asia (7%) — Turkey
	nonH58_S7	WT	1	Ulyanovsk 2010	
3.0.1	nonH58_G4	WT	2	St. Petersburg 2010 and 2011	North Africa (50%) — Morocco South Asia (50%) — Pakistan
3.0.2	nonH58_S6	<i>gyrA</i> (Ser83Phe)	1	St. Petersburg 2012	South Asia (100%) — India
4.1.1	nonH58	WT	1	Voronezh 2015	Southern Africa (78%) — Malawi South Africa (11%) West Africa (6%) — Mauritania Central Africa (6%) — Cameroon
4.3.1.1.	H58_G3	<i>gyrA</i> (Asp87Asn)	54	St. Petersburg 2006 (outbreak), 2007, 2010–2012, 2014 and 2017; Moscow 2011 and 2013 (outbreak); Kaliningrad 2011 and 2012; Khabarovsk 2012; Voronezh 2014; Irkutsk 2015	South-East Asia (50%) — Vietnam, Laos, Cambodia South Asia (26%) — India, Bangladesh, Pakistan, Nepal, Sri Lanka, Afghanistan East Africa (10%) — Tanzania, Kenia Southern Africa (9%) — Malawi
	H58_G2	<i>gyrA</i> (Asp87Asn)	5	St. Petersburg 2008; Khanty-Mansiysk 2009; Jewish Autonomous region 2011; Irkutsk 2017	
		<i>gyrA</i> (Asp87Asn) + p IncHI1B(R27)	2	St. Petersburg 2013 and 2015	
	H58_S2	WT	1	Irkutsk 2012	
	H58_S4	WT	1	St. Petersburg 2011	
4.3.1.2	H58_G1	<i>gyrA</i> (Ser83Phe+ Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile)	9	Kaliningrad 2011 and 2012; Smolensk 2011; Kirov 2015; Khanty-Mansiysk 2016; Voronezh 2017; Krasnoyarsk 2017; St. Petersburg 2018	
		<i>gyrA</i> (Ser83Phe+ Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile) + p IncI	1	Arkhangelsk 2015	
	H58_S1	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr) + p IncHI1B(R27)	1	St. Petersburg 2006	
	H58_S3	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr)	1	Arkhangelsk 2011	
	H58_S5	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr)	1	St. Petersburg 2011	

WT — wild type, susceptible to fluoroquinolones and other antibiotics.

Primary cluster 1, subclade 1.2.1 included eight antimicrobial susceptible *S. Typhi* isolates, also belonged to the same phylogenetic group (G6). It is interesting to note that some susceptible *S. Typhi* from our collection, isolated in Kyrgyzstan and Kazakhstan in 2010 and 2012, also belonged to this subclade. According to Wong et al. [47] the *S. Typhi* isolates of subclade 1.2.1 originate from countries in South-East Asia.

The primary clusters 2 and 3 and their subclades in our study were presented by single *S. Typhi* isolates full susceptible to antibiotics or with fluoroquinolone low-level resistance due to *gyrA* Ser83Phe (not detected as single substitution in other clusters).

Discussion

The *S. Typhi* population isolated in 2005–2018 in St. Petersburg and 20 other regions of the Russian Federation consisted of the isolates with different resistance phenotypes and mechanisms and genetically heterogeneous. Only 10.4% *S. Typhi* were susceptible to antibiotics, 89.6% *S. Typhi* had fluoroquinolone resistance (7.3% with high-level resistance), which is a clinical fail predictor of using the fluoroquinolones for the empirical treatment of typhoid fever in Russia. Evaluation of the level of fluoroquinolone resistance in *S. Typhi* is important for choice of antimicrobial treatment of typhoid fever. There is clinical evidence of the ciprofloxacin poor clinical efficacy in typhoid fever, caused by *S. Typhi* with low-level resistance [11]. In this case, it is recommended to use alternative antibiotics: cephalosporins or azithromycin [13, 47]. But the some authors showed the high efficiency of gatifloxacin (the last generation fluoroquinolone) in treatment of typhoid fever when *S. Typhi* population had a high proportion of isolates with low-level resistance to ciprofloxacin [12, 44]. The fluoroquinolones (regardless of the drug or dosage) should not be used for *S. Typhi* with fluoroquinolone high-level resistance. The interpretive criteria for *S. Typhi* and ciprofloxacin differs from other Enterobacterales. According to EUCAST *S. Typhi* should be consider as “resistant” with MIC of ciprofloxacin > 0.06 mg/l. For the disc diffusion method, pefloxacin disc should be used instead of ciprofloxacin.

The level of fluoroquinolone resistance in Enterobacterales (MIC of ciprofloxacin) depends on the resistance mechanisms. The primary targets for the fluoroquinolones are the subunits of DNA gyrase (GyrA and GyrB) and the topoisomerase IV (ParC and ParE). Nonsynonymous single nucleotide substitutions in the quinolone resistance-determining regions of chromosome genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* decrease the fluoroquinolone susceptibility [1, 9, 19, 26, 28, 31, 42]. Single nucleotide substitutions, mainly in *gyrA*, leads to low-level resistance (MIC of ciprofloxacin 0.12–0.5 mg/l), the most common nucleotide substitutions in *S. Typhi* are in the codons 83 and 87 of *gyrA*, leading to amino acid substitu-

tions Ser83Phe or Asp87Asn. Some plasmid-mediated mechanisms are associated with fluoroquinolone low-level resistance: in *S. Typhi* the genes *qnrS*, *qnrB* and *aac(6′)-Ib-cr* are rarely described [15, 23, 30, 34, 43]. The emergence of high-level resistance (MIC of ciprofloxacin 1.0 mg/l and more) is always associated with the combination of several resistance mechanisms: the accumulation of single nucleotide substitutions in chromosomal genes or the acquisition of additional plasmid-mediated resistance genes by an isolate that already has any chromosomal resistance mutations.

Despite of identical fluoroquinolone resistance phenotype (low-level resistance) Russian *S. Typhi* population had different single nucleotide substitutions in *gyrA*: Asp87Asn (78.7%), Ser83Tyr (5.0%) and Ser83Phe (3.2%). High-level fluoroquinolone resistance was due to accumulation of three single nucleotide substitutions: *gyrA* (Asp87Asn+Ser83Phe) and *parC* (Ser80Ile). Plasmid-mediated fluoroquinolone low-level resistance (*qnrS*) was found in only one isolate. So, the leading fluoroquinolones resistance mechanism in Russian *S. Typhi* population is single nucleotide substitution in *gyrA* Asp87Asn.

About 3.0% of *S. Typhi* isolates had multidrug resistance to the antibiotics used for treatment of typhoid fever (fluoroquinolones, chloramphenicol, ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole). MDRST phenotype was a result of the acquisition plasmid-mediated resistance genes (*bla*_{TEM-1}, *catA1*, *dfrA7* and *tetB*) by the isolates that already had a chromosomal mutation in *gyrA* Ser83Tyr or Asp87Asn. It also complicates the antibiotic choice for the therapy of typhoid fever caused by such isolates.

Taking into account the wide spread of fluoroquinolone resistant *S. Typhi* and the lack of the resistance to extended-spectrum cephalosporins and azithromycin, these antibiotics can be considered as the drugs of first choice for the treatment of typhoid fever in Russia. EUCAST has no criteria for the interpretation of azithromycin for Enterobacterales, and it is proposed to use the “epidemiological cut off value” and consider as “susceptible” to azithromycin the isolates with MIC ≤ 16.0 mg/l. Antimicrobial susceptibility testing of azithromycin by disc diffusion method isn’t possible due to the lack of interpretation criteria for this method, as well as uncertain test results [33].

More than 80.0% of *S. Typhi* isolates, imported to the Russian Federation in 2005–2018, belonged to successful international Asian clone — “subclade 4.3.1” by Wong et al. [47] or dominant H58 clade of *S. Typhi* [41, 46] and with high probability originated from the countries of South-East and South Asia. In Russia, this dominant phylogenetic group mainly included the isolates with the same resistance phenotype and mechanisms: about 60.0% had fluoroquinolone low-level resistance due to the single nucleotide substitution in *gyrA* Asp87Asn. All *S. Typhi* isolates with fluoroquinolone high-level resistance (due tree single nucleotide substitutions in *gyrA* and

parC) and MDRST isolates also belonged to subclade 4.3.1. The isolates of this subclade caused the typhoid fever cases in different years in all regions of the Russian Federation. According the epidemiological data in many cases the patients were infected travelling to India (the tourists and Indian students of Russian universities). Only single *S. Typhi* isolates belonged to subclades other than 4.3.1 and differed by full antimicrobial susceptibility or the mutations non common for Russian *S. Typhi* population.

Based on the results of this study, the Russian *S. Typhi* Reference Center Database was created.

As well as in other economic developed countries, the cases of the typhoid fever in the Russian Federation are mainly caused by resistant *S. Typhi* imported by the tourists, students or labor migrants from typhoid-endemic South-East Asia countries. In this situation the patients with fever and diarrhea who visited these countries within the incubation period (14–21 days) should be obligatory blood and faeces examined for *S. Typhi*. Despite of the only sporadic typhoid fever cases registered annually in Russia, the antimicrobial resistance of *S. Typhi* is a serious problem in our country.

Список литературы/References

- Accou-Demartin M., Gaborieau V., Song Y., Roumagnac P., Marchou B., Achtman M., Weill F.-X. Salmonella enterica Serotype Typhi with nonclassical quinolone resistance phenotype. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 6, pp. 1091–1094. doi: 10.3201/eid1706.101242
- Achtman M., Wain J., Weill F.-X., Nair S., Zhou Z., Sangal V., Krauland M.G., Hale J.L., Harbottle H., Uesbeck A., Dougan G., Harrison L.H., Brisse S., S. Enterica MLST Study Group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica. *PLoS Pathogens*, 2012, vol. 8, no. 6: e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776
- Ahamed Riyaaz A.A., Perera V., Sivakumaran S., de Silva N. Typhoid fever due to extended spectrum β -lactamase-producing Salmonella enterica serovar Typhi: a case report and literature review. *Case Reports in Infect. Dis.*, 2018: 4610246. doi: 10.1155/2018/4610246
- Akinyemi K.O., Iwalokun B.A., Alafe O.O., Mudashiru S.A., Fakorede C. blaCTX-M-I group extended spectrum beta lactamase-producing Salmonella typhi from hospitalized patients in Lagos, Nigeria. *Infect. Drug. Resist.*, 2015, vol. 11, no. 8, pp. 99–106. doi: 10.2147/IDR.S78876
- Akinyemi K.O., Iwalokun B.A., Oyefolu A.O., Fakorede C.O. Occurrence of extended-spectrum and AmpC β -lactamases in multiple drug resistant Salmonella isolates from clinical samples in Lagos, Nigeria. *Infect. Drug. Resist.*, 2017, vol. 10, pp. 19–25. doi: 10.2147/IDR.S123646
- Al Naiemi N., Zwart B., Rijnsburger M.C., Roosendaal R., Debets Ossenkopp Y.J., Mulder J.A., Fijen C.A., Maten W., Vandenbroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H. Extended-spectrum-beta-lactamase production in a Salmonella enterica serotype Typhi strain from the Philippines. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, pp. 2794–2795. doi: 10.1128/JCM.00676-08
- Baltazar M., Ngandjio A., Holt K.E., Lepillet E., Pardos de la Gandara M., Collard J.M., Bercion R., Nzouankeu, A., Le Hello S., Dougan G., Fonkoua M.C., Weill F.-X. Multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhi, Gulf of Guinea Region, Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, vol. 21, no. 4, pp. 655–659. doi: 10.3201/eid2104.141355
- CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018.
- Chau T.T., Campbell J.I., Galindo C.M., Van Minh Hoang N., Diep T.S., Nga T.T., Van Vinh Chau N., Tuan P.Q., Page A.L., Ochiai R.L., Schultsz C., Wain J., Bhutta Z.A., Parry C.M., Bhattacharya S.K., Dutta S., Agtini M., Dong B., Honghui Y., Anh D.D., Canh do G., Naheed A., Albert M.J., Phetsouvanh R., Newton P.N., Basnyat B., Arjyal A., La T.T., Rang N.N., Phuong le T., Van Be Bay P., von Seidlein L., Dougan G., Clemens J.D., Vinh H., Hien T.T., Chinh N.T., Acosta C.J., Farrar J., Dolecek C. Antimicrobial drug resistance of Salmonella enterica serovar typhi in Asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, no. 12, pp. 4315–4323. doi: 10.1128/AAC.00294-07
- Crump J.A., Luby S.P., Mintz E.D. The global burden of typhoid fever. *Bull. World Health Organ.*, 2004, vol. 82, pp. 346–353.
- Crump J.A., Kretsinger K., Gay K. Clinical response and outcome of infection with Salmonella enterica serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States FoodNet multicentre retrospective study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, vol. 52, pp. 1278–1284. doi: 10.1128/AAC.01509-07
- Dolecek C., Tran T.P., Nguyen N.R., Le T.P., Ha V., Phung Q.T., Doan C.D., Nguyen T.B., Duong T.L., Luong B.H., Nguyen T.B., Nguyen T.A., Pham N.D., Mai N.L., Phan V.B., Vo A.H., Nguyen V.M., Tran T.T., Tran T.C., Schultsz C., Dunstan S.J., Stepniewska K., Campbell J.I., To S.D., Basnya, B., Nguyen V.V., Nguyen V.S., Nguyen T.C., Tran T.H., Farrar J. A multi-center randomised controlled trial of gatifloxacin versus azithromycin for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children and adults in Vietnam. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 5: e2188. doi: 10.1371/journal.pone.0002188
- Effa E.E., Bukirwa H. Azithromycin for treating uncomplicated typhoid and paratyphoid fever (enteric fever). *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2011, vol. 10: CD006083. doi: 10.1002/14651858.CD006083.pub3
- Effa E.E., Lassi Z.S., Critchley J.A., Garner P., Sinclair D., Olliaro P.L., Bhutta Z.A. Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever). *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2011, vol. 10: CD004530. doi: 10.1002/14651858.CD004530.pub4
- Geetha V.K., Yugendran T., Srinivasan R., Harish B.N. Plasmid-mediated quinolone resistance in typhoidal Salmonellae: a preliminary report from South India. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 32: pp. 31–34. doi: 10.4103/0255-0857.124292
- Gokul B.N., Godfred A. Menezes G.A., Belgode N., Harish B.N. ACC-1 β -Lactamase— producing Salmonella enterica Serovar Typhi, India. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, no. 7, pp. 1170–1171. doi: 10.3201/eid1607.091643
- González-López J., Piedra-Carrasco N., Salvador F., Rodríguez V., Sánchez-Montalvá A., Planes A.M., Molina I., Larrosa M.N. ESBL-producing Salmonella enterica serovar Typhi in traveler returning from Guatemala to Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1918–1920. doi: 10.3201/eid1607.091643

18. Gul D., Potter R.F., Riaz H., Ashraf S.T., Wallace M.A., Munir T., Ali A., Burnham C.-A., Dantas G., Andleeb S. Draft genome sequence of a *Salmonella enterica* serovar Typhi strain resistant to fourth-generation cephalosporin and fluoroquinolone antibiotics. *Genome Announc.*, 2017, vol. 5, no. 42: e00850–17. doi: 10.1128/genomeA.00850-17
19. Gupta R., Gaiind R., Wain J., Deb M., Singh L.C., Basir S.F. Characterization of non-classical quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi: Report of a novel mutation in *gyrB* gene and diagnostic challenges. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2015, vol. 2, pp. 30–34. doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.003
20. Hendriksen R.S., Leekitcharoenphon P., Mikoleit M., Jensen J.D., Kaas R.S., Roer L., Joshi H.B., Pornruangmong S., Pulsrikarn C., Gonzalez-Aviles G.D., Reuland E.A., Al Naiemi N., Wester A.L., Aarestrup F.M., Hasman H. Genomic dissection of travel-associated extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar typhi isolates originating from the Philippines: a one-off occurrence or a threat to effective treatment of typhoid fever? *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 2, pp. 677–680. doi: 10.1128/JCM.03104-14
21. Holt K.E., Parkhill J., Mazzoni C.J., Roumagnac P., Weill F.-X., Goodhead I., Rance R., Baker S., Maskell D.J., Wain J., Dolecek C., Achtman M., Dougan G. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat. Genet.*, 2008, vol. 40, no. 8, pp. 987–993. doi: 10.1038/ng.195
22. International Typhoid Consortium, Wong V.K., Holt K.E., Okoro C., Baker S., Pickard D.J., Marks F., Page A.J., Olanipekun G., Munir H., Alter R., Fey P.D., Feasey N.A., Weill F.-X., Le Hello S., Hart P.J., Kariuki S., Breiman R.F., Gordon M.A., Heyderman R.S., Jacobs J., Lunguya O., Msefula C., MacLennan C.A., Keddy K.H., Smith A.M., Onsare R.S., De Pinna E., Nair S., Amos B., Dougan G., Obaro S. Molecular surveillance identifies multiple transmissions of typhoid in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 10, no. 9: e0004781. doi: 10.1371/journal.pntd.0004781
23. Keddy K.H., Smith A.M., Sooka A., Ismail H., Oliver S. Fluoroquinolone-resistant typhoid, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, pp. 879–880. doi: 10.3201/eid1605.091917
24. Kidgell C., Reichard J., Wain J., Linz B., Torpdahl M., Dougan G. *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect. Genet. Evol.*, 2002, vol. 2, no. 1, pp. 39–45. doi: 10.1016/S1567-1348(02)00089-8
25. Kothari A., Pruthi A., Chugh T.D. The burden of enteric fever. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 2008, vol. 2, no. 4, pp. 253–259. doi: 10.3855/jidc.218
26. Kuijpers L., Phe T., Veng C.H., Lim K., Ieng S., Kham C., Fawal N., Fabre L., Le Hello S., Vlieghe E., Weill F.-X., Jacobs J., Peetermans W.E. The clinical and microbiological characteristics of enteric fever in Cambodia, 2008–2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11, no. 9: e0005964. doi: 10.1371/journal.pntd.0005964
27. Kuleshov K.V., Kostikova A., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Tikhonov S.N., Savelieva I.V., Saveliev V.N., Vasilieva O.V., Zinich L.S., Pidchenko N.N., Kulichenko A.N., Shipulin G.A. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011. *Infect. Genet. Evol.*, 2016, vol. 44, pp. 471–478. doi: 10.1016/j.meegid.2016.07.039
28. Matono T., Morita M., Yahara K., Lee K., Izumiya H., Kaku M., Ohnishi M. Emergence of resistance mutations in *Salmonella enterica* serovar Typhi against fluoroquinolones. *Open Forum Infect. Dis.*, 2017, vol. 4, no. 4: ofx230. doi: 10.1093/ofid/ofx230
29. Mirza S., Beeching N., Hart C. Multi-drug resistant typhoid: a global problem. *J. Med. Microbiol.*, 1996, vol. 44, pp. 317–319. doi: 10.1099/00222615-44-5-317
30. Nüesch-Inderbilen M., Abgottspion H., Sägesser G., Cernela N., Stephan R. Antimicrobial susceptibility of travel-related *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates detected in Switzerland (2002–2013) and molecular characterization of quinolone resistant isolates. *BMC Infect. Dis.*, 2015, vol. 15: 212. doi: 10.1186/s12879-015-0948-2
31. Okanda T., Haque A., Ehara T., Huda Q., Ohkusu K., Miah R.A., Matsumoto T. Characteristics of resistance mechanisms and molecular epidemiology of fluoroquinolone-nonsusceptible *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A isolates from a Tertiary Hospital in Dhaka, Bangladesh. *Microb. Drug Resist.*, 2018, vol. 24, no. 10. doi: 10.1089/mdr.2018.0039
32. Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahn D., Hooper D.C. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 11, pp. 3953–3955. doi: 10.1128/AAC.00915-06
33. Parry C.M., Thieu N.T.V., Dolecek C., Karkey A., Gupta R., Turner P., Dance D., Maude R.R., Ha V., Tran C.N., Thi P.L., Be B.P.V., Phi L.T.T., Ngoc R.N., Ghose A., Dongol S., Campbell J.I., Thanh D.P., Thanh T.H., Moore C.E., Sona S., Gaiind R., Deb M., Anh H.V., Van S.N., Tinh H.T., Day N.P., Dondorp A., Thwaites G., Faiz M.A., Phetsouvanh R., Newton P., Basnyat B., Farrar J.J., Baker S. Clinically and microbiologically derived azithromycin susceptibility breakpoints for *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 2756–2764. doi: 10.1128/AAC.04729-14
34. Pfeifer Y., Matten J., Rabsch W. *Salmonella enterica* serovar Typhi with CTX-M β -lactamase, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, pp. 1533–1535. doi: 10.3201/eid1509.090567
35. Phoba M.F., Barbé B., Lunguya O., Masendu L., Lulengwa D., Dougan G., Wong V.K., Bertrand S., Ceysens P.J., Jacobs J., Van Puyvelde S., Deborggraeve S. *Salmonella enterica* serovar Typhi producing CTX-M-15 extended spectrum β -lactamase in the Democratic Republic of the Congo. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 65, no. 7, pp. 1229–1231. doi: 10.1093/cid/cix342
36. Pokharel B.M., Koirala J., Dahal R.K., Mishra S.K., Khadga P.K., Tuladhar N.R. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. *Int. J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 10, no. 6, pp. 434–438. doi: 10.1016/j.ijid.2006.07.001
37. Ramachandran A., Shanthi M., Sekar U. Detection of blaCTX-M extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* serotype Typhi in a tertiary care centre. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2017, vol. 11, no. 9: DC21-DC24. doi: 10.7860/JCDR/2017/30150.10637
38. Robicsek A., Strahilevitz J., Sahn D.F., Jacoby G.A., Hooper D.C. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antim. Agents Chemot.*, 2006, vol. 50, no. 8, pp. 2872–2874. doi: 10.1128/AAC.01647-05
39. Rodrigues C., Kapil A., Sharma A., Devanga Ragupathi N.K., Inbanathan F.Y., Veeraraghavan B., Kang G. Whole genome shotgun sequencing of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Genome Announc.*, 2017, vol. 5: e01639-16. doi: 10.1128/genomeA.01639-16
40. Rotimi V., Jamal W., Pal T., Sovenned A., John Albert M. Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum b-lactamase-producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. *J. Med. Microbiol.*, 2008, vol. 57, pp. 881–886. doi: 10.1099/jmm.0.47509-0

41. Roumagnac P., Weill F.-X., Dolecek C., Baker S., Brisse S., Chinh N.T., Le T.A., Acosta C.J., Farrar J., Dougan G., Achtman M. Evolutionary history of Salmonella Typhi. *Science*, 2006, vol. 314, no. 5803, pp. 1301–1304. doi: 10.1126/science.1134933
42. Song Y., Roumagnac P., Weill F.-X., Wain J., Dolecek C., Mazzoni C.J., Holt K.E., Achtman M. A multiplex single nucleotide polymorphism typing assay for detecting mutations that result in decreased fluoroquinolone susceptibility in Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 2010, vol. 65, no. 8, pp. 1631–1641. doi: 10.1093/jac/dkq175
43. Tadesse G., Tessema T.S., Beyene G., Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant Salmonella in Africa: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 2: e0192575. doi: 10.1371/journal.pone.0192575
44. Thompson C.N., Karkey A., Dongol S., Arjyal A., Wolbers M., Darton T., Farrar J.J., Thwaites G.E., Dolecek C., Basnyat B., Baker S. Treatment response in enteric fever in an era of increasing antimicrobial resistance: an individual patient data analysis of 2092 participants enrolled into 4 randomized, controlled trials in Nepal. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 64, no. 11, pp. 1522–1531. doi: 10.1093/cid/cix185
45. Weill F.-X. La fièvre typhoïde n'est plus aussi simple à soigner. *Med. Sci.*, 2010, vol. 26, pp. 969–975. doi: 10.1051/medsci/20102611969
46. Wong V.K., Baker S., Pickard D.J., Parkhill J., Page A.J., Feasey N.A., Kingsley R.A., Thomson, N.R., Keane J.A., Weill F.-X., Edwards D.J., Hawkey J., Harris S.R., Mather A.E., Cain A.K., Hadfield J., Hart P.J., Thieu N.T., Klemm E.J., Glinos D.A., Breiman R.F., Watson C.H., Kariuki S., Gordon M.A., Heyderman R.S., Okoro C., Jacobs J., Lunguya O., Edmunds W.J., Msefula C., Chabalgoity J.A., Kama M., Jenkins K., Dutta S., Marks F., Campos J., Thompson C., Obaro S., MacLennan C.A., Dolecek C., Keddy K.H., Smith A.M., Parry C.M., Karkey A., Mulholland E.K., Campbell J.I., Dongol S., Basnyat B., Dufour M., Bandaranayake D., Naseri T.T., Singh S.P., Hatta M., Newton P., Onsare, R.S., Isaiya L., Dance D., Davong V., Thwaites G., Wijedoru L., Crump J.A., De Pinna E., Nair S., Nilles E.J., Thanh D.P., Turner P., Soeng S., Valcanis M., Powling J., Dimovski K., Hogg G., Farrar J., Holt K.E., Dougan G. Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of Salmonella Typhi identifies inter- and intracontinental transmission events. *Nat. Genet.*, 2015, vol. 47, no. 6, pp. 632–641. doi: 10.1038/ng.3281
47. Wong V.K., Baker S., Connor T.R., Pickard D., Page A.J., Dave J., Murphy N., Holliman R., Sefton A., Millar M., Dyson Z.A., Dougan G., Hol K.E., International Typhoid Consortium. An extended genotyping framework for Salmonella enterica serovar Typhi, the cause of human typhoid. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7: 12827. doi: 10.1038/ncomms12827
48. World Health Organization (WHO). The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. WHO/V&B/03.07. Geneva: WHO; 2003

Авторы:

Егорова С.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Кулешов К.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия;
Кафтырева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Матвеева З.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Egorova S.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kuleshov K.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Diseases Epidemiology and Molecular Diagnostic, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Kaftyreva L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Matveeva Z.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.03.2019
 Отправлена на доработку 11.04.2019
 Принята к печати 11.03.2020

Received 26.03.2019
 Revision received 11.04.2019
 Accepted 11.03.2020

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК МЕНИНГОКОККА, ПНЕВМОКОККА, ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ И СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ А В БИОПТАТАХ АДЕНОИДОВ У ДЕТЕЙ

С.Ю. Комбарова¹, А.М. Бичучер¹, Ю.Л. Солдатский², Р.Ю. Юнусова¹, Т.А. Скирда¹, И.Г. Мартыненко¹, Л.И. Головина¹, С.Р. Эдгем², Т.В. Северин², В.Г. Мельников¹

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

² ГБУЗ Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Резюме. Менингококковая, пневмококковая, стрептококковая группы А и гемофильная инфекции имеют разнообразные формы проявления — от бактерионосительства до генерализованных, угрожающих жизни состояний. Вместе с тем взаимосвязь между носительством возбудителей этих инфекций и развитием заболевания все еще остается не полностью изученной. Для диагностики носительства менингококка, пневмококка, гемофильной палочки и стрептококка группы А с помощью ПЦР были исследованы биоптаты аденоидных вегетаций у 112 детей, которым в плановом порядке была проведена аденотомия. ДНК хотя бы одного из четырех детектируемых видов микроорганизмов обнаружена в 104 образцах (92,86%), из них: ДНК менингококка — в одном образце (0,9%), пневмококка — в 98 (87,5%), гемофильной палочки — в 19 (16,96%), стрептококка группы А — в 42 (37,5%) образцах. Не найдено ни одного из указанных видов микроорганизмов у 8 детей (7,14%). *S. pneumoniae*, в отсутствие других исследуемых видов бактерий был обнаружен в 54 образцах (48,2%), *S. pyogenes* — в 5 образцах (4,5%). Одновременно два вида искомым бактерий встречались в следующих сочетаниях: *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* — в 1 образце (0,9%), *S. pneumoniae* и *H. influenzae* — в 7 образцах (6,3%); *H. influenzae* и *S. pyogenes* — в 1 образце (0,9%); *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* — в 25 образцах (22,3%). Три вида бактерий — *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. pyogenes* — были одновременно выявлены у 11 пациентов (9,8%). Проведенное серогруппирование менингококка не подтвердило его принадлежности ни к одной из 6 наиболее распространенных в мире серогрупп, ответственных за эпидемические подъемы заболеваемости (А, В, С, W-135, X, Y). Прослеживается явная тенденция преобладания ДНК *S. pyogenes* в биоптатах аденоидов у детей с диагнозом «Гипертрофия аденоидов и миндалин», по сравнению с диагнозом «Гипертрофия аденоидов». Обращает на себя внимание высокий удельный вес носительства пневмококка (87,5%), установленный в нашем исследовании. Носители, являющиеся резервуаром вирулентных пневмококков, представляют опасность как для самих себя, так и для окружающих. Таким образом, ПЦР-исследование биоптатов аденоидов является перспективным направлением дальнейших исследований, так как возможность выявления некультивируемых форм микроорганизмов в клинических образцах будет способствовать более точной оценке уровня носительства менингококков, пневмококков, гемофильной палочки и стрептококков группы А.

Ключевые слова: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, бактерионосительство, биоптаты аденоидов, ПЦР.

Адрес для переписки:

Комбарова Светлана Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (495) 452-20-36. Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: kombarova311@bk.ru

Contacts:

Svetlana Yu. Kombarova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and
Microbiology.
Phone: +7 (495) 452-20-36. Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: kombarova311@bk.ru

Библиографическое описание:

Комбарова С.Ю., Бичучер А.М., Солдатский Ю.Л., Юнусова Р.Ю., Скирда Т.А., Мартыненко И.Г., Головина Л.И., Эдгем С.Р., Северин Т.В., Мельников В.Г. Выявление ДНК менингококка, пневмококка, гемофильной палочки и стрептококка группы А в биоптатах аденоидов у детей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 111–120.
doi: 10.15789/2220-7619-DOM-1163

Citation:

Kombarova S.Yu., Bichucher A.M., Soldatsky Yu.L., Yunusova R.Yu., Skirda T.A., Martynenko I.G., Golovina L.I., Edgem S.R., Severin T.V., Melnikov V.G. Detection of meningococcus, pneumococcus, Haemophilus influenzae, and group A streptococcus DNA in pediatric adenoid biopsats // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 111–120. doi: 10.15789/2220-7619-DOM-1163

DETECTION OF MENINGOCOCCUS, PNEUMOCOCCUS, HAEMOPHILUS INFLUENZAE, AND GROUP A STREPTOCOCCUS DNA IN PEDIATRIC ADENOID BIOPSTATS

Kombarova S.Yu.^a, Bichucher A.M.^a, Soldatsky Yu.L.^b, Yunusova R.Yu.^a, Skirda T.A.^a, Martynenko I.G.^a, Golovina L.I.^a, Edgem S.R.^b, Severin T.V.^b, Melnikov V.G.^a

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

^b Morozovskaya Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Abstract. Meningococcal, pneumococcal, streptococcal A and *Haemophilus influenzae* infections are manifested in different clinical forms, ranging from bacterial carriage to generalized life-threatening conditions. However, a connection between bacterial carriage and disease development has not been fully explored. A PCR assay was performed with adenoid biopsy samples collected from 112 children after planned adenotomy to detect *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *H. influenzae* carriage. A DNA specific to at least one of the four studied microbial species was found in 104 samples (92.86%) so that: meningococcal DNA was detected in one sample (0.9%), pneumococcal — in 98 (87.5%), *H. influenzae* — in 19 (16.96%), and streptococcal A — in 42 (37.5%) samples. However, none of these species was found in 8 children (7.14%). A sole *S. pneumoniae* was detected in 54 samples (48.2%), whereas *S. pyogenes* — in 5 samples (4.5%). Moreover, two bacterial species were simultaneously as follows: *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* — in 1 sample (0.9%), *S. pneumoniae* and *H. influenzae* — in 7 samples (6.3%); *H. influenzae* and *S. pyogenes* — in 1 sample (0.9%); *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* — in 25 samples (22.3%). A triple combination consisting of *S. pneumoniae*, *H. influenzae* and *S. pyogenes* bacteria were detected together in 11 patients (9.8%). Meningococcal serogrouping revealed no connection with any of the 6 most common global serogroups responsible for epidemic incidence rise (A, B, C, W-135, X, Y). A clear tendency for prevalence of *S. pyogenes* DNA in adenoid pediatric biopsies in children diagnosed with “Adenoids and tonsils hypertrophy” vs. “Adenoids hypertrophy” was observed. It is noteworthy, a high relative prevalence of pneumococcal carriage (87.5%), found by us was of special importance. Pediatric carriers serving as a reservoir for virulent pneumococcal species pose a threat both for themselves and surrounding people. Thus, PCR-based data of adenoid biopsies may be a promising approach for future studies, as a potential to identify live viable but nonculturable bacteria in clinical specimens will contribute to a more accurate assessment of carriage rate of meningococci, pneumococci, *H. influenzae* and group A streptococci.

Key words: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, bacterial carriage, adenoid biopstats, PCR.

Введение

Менингококковая, пневмококковая, стрептококковая А и гемофильная инфекции относятся к группе болезней, имеющих разнообразные формы проявления — от бактерионосительства до генерализованных, угрожающих жизни человека состояний, среди которых выделяют гнойные бактериальные менингиты (ГБМ), являющиеся тяжелой инвазивной патологией, при которой в гнойный воспалительный процесс вовлекаются оболочки головного и спинного мозга. Заболевание может развиваться в любом возрасте, но наиболее уязвимы дети первых трех лет жизни [4, 9].

Основными этиологическими агентами ГБМ, на долю которых приходится более 90% этиологически расшифрованных случаев, являются менингококк, пневмококк и гемофильная палочка типа b. Таксономически *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* принадлежат к разным родам и даже семействам бактерий, но имеют и некоторое сходство. Данные бактерии могут населять слизистые оболочки верхних дыхательных путей, не вызывая у людей признаков заболевания (феномен бактерионосительства). Все три

микроорганизма объединяет способность формировать капсулу, что является важнейшим свойством патогенности. Однако капсулообразование часто реализуется только при инвазии тканей и диссеминации внутри организма хозяина [5].

Еще одним представителем рода *Streptococcus*, имеющим медицинское значение и способным бессимптомно персистировать на слизистых оболочках человека, является стрептококк группы А (*Streptococcus pyogenes*). С ним связан исключительно широкий спектр инфекционной патологии и осложнений: от первичных гнойно-воспалительных заболеваний ЛОР-органов и кожи до вторичных форм с выраженным аутоиммунным компонентом патогенеза (ревматизм, гломерулонефрит, васкулиты), а также инвазивных или генерализованных форм (пневмония, некротический фасциит, миозит, менингит, перитонит, остеомиелит, сепсис, синдром токсического шока и др.) [1].

Поскольку бактерионосители являются резервуаром инфекции, не вызывает сомнений важность оценки уровня носительства менингококка, пневмококка, гемофильной палочки и стрептококка группы А в различных коллективах, особенно среди детей. Для этого требуются

наиболее чувствительные и специфичные методы выявления бактерий в клиническом материале. Возможности бактериологического метода диагностики в данном случае весьма ограничены, поскольку *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *H. influenzae* в носоглотке носителей образуют биопленку, которая в основном состоит из бактерий, не способных расти на питательных средах [5, 13, 29]. Показано, что культивируемые бактерии составляют только небольшую часть от популяции микроорганизмов, которые населяют слизистую оболочку носоглотки. Наиболее полно микробный состав той или иной экологической ниши может быть охарактеризован только с помощью современных молекулярных технологий [15].

Есть сведения, что использование иммуногистохимического метода диагностики на основе меченых моноклональных антител к белку менингококка Pore A позволяет выявить *N. meningitidis* в тканях аденоидов в 4 раза чаще, чем в мазках из носоглотки с помощью традиционного микробиологического метода [26]. Показано также, что выявление менингококка в тканях удаленных аденоидов с помощью ПЦР является более эффективным методом, по сравнению с иммуногистохимическим исследованием и традиционным микробиологическим посевом [14]. На преимущества метода ПЦР указывают и результаты Rizek и соавт. [25]. Слизь из носоглотки от 190 здоровых людей была исследована на содержание *N. meningitidis* двумя методами — бактериологическим и ПЦР. Благодаря использованию техники посева материала на питательные среды было выявлено 23 (12,1%) бактерионосителя, а с помощью ПЦР менингококки были обнаружены у 132 (69,5%) обследуемых.

Итак, роль бактерионосителей в поддержании эпидемического процесса менингококковой, пневмококковой, стрептококковой А и гемофильной инфекции может оказаться более значимой, чем принято было считать. Результаты приведенных выше работ дают основания полагать, что выявление бактериальной ДНК в биоптатах аденоидных вегетаций с помощью ПЦР может оказаться эффективным методическим приемом для оценки уровня носительства *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *H. influenzae*.

Цель исследования: проведение скрининга биоптатов аденоидов у детей, подвергшихся аденотомии в плановом порядке, на наличие ДНК *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. pyogenes* для оценки уровня носительства этих бактерий.

Исследование одобрено Этическим комитетом ГБУЗ «Морозовская ДГКБ Департамента здравоохранения г. Москвы».

Материалы и методы

Клинические образцы. Биоптаты аденоидных вегетаций получены во время аденотомии у 112 клинически здоровых детей, проживающих в Москве и Московской области, в возрасте от 1 года до 12 лет, планово госпитализированных в оториноларингологическое отделение Морозовской ДГКБ в 2016 и в 2017 гг. с диагнозами «Гипертрофия аденоидов» (86 детей) и «Гипертрофия аденоидов и небных миндалин» (26 детей) для хирургического лечения. В 2016 г. обследовано 50 детей, в 2017 г. — 62 ребенка. Всем пациентам в предоперационном периоде было рекомендовано в течение 7 дней до госпитализации проводить орошение рото- и носоглотки коммерческими растворами антибиотиков и антисептиков (Фрамицетин; Дексаметазон + Неомицин + Полимиксин В + Фенилэфрин; Бензилдиметилмиристоиламино-пропиламмоний).

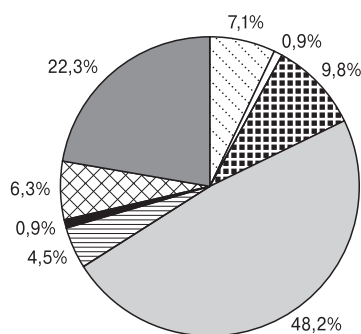
Методика получения биоптатов. Под наркозом после интубации трахеи в полость рта вводили роторасширитель и поднимали мягкое небо при помощи стерильных катетеров, проведенных через полость носа. Аспирировали слизь из полости носа и носоглотки. Конхотомом из средней части гипертрофированной лимфоидной ткани носоглотки получали два образца (один — для гистологического исследования, второй — для проведения настоящего исследования), затем приступали к стандартной аденотомии при помощи микродебридера. Биопсийные образцы немедленно замораживали при температуре -20°C и хранили до исследования не более двух недель. При гистологическом исследовании биоптатов аденоидов клеточной атипии не было выявлено ни в одном случае.

Экстракция ДНК. К каждому образцу массой приблизительно 200 мг добавляли по 200 мкл стерильного охлажденного до $+4^{\circ}\text{C}$ физиологического раствора и стерильный шарик из нержавеющей стали диаметром 7 мм. Пробирки с образцами и шариками помещали в лабораторный гомогенизатор «TissueLyser LT» (Qiagen, Германия). Гомогенизацию проводили в течение 5 мин, режим — 30 встряхиваний в секунду. Экстракцию ДНК из образцов проводили с помощью набора реагентов для выделения общей ДНК «QIAamp DNA Mini Kit (50)» (Qiagen, Германия), согласно инструкции. Очищенную ДНК хранили при температуре -20°C .

ПЦР. Обнаружение ДНК *N. meningitidis*, *H. influenzae* и *S. pneumoniae* в клиническом материале проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с помощью набора реагентов «АмплиСенс *N. meningitidis*/*H. influenzae*/*S. pneumoniae*-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции к набору. Для подтвержде-

Таблица 1. Частота встречаемости ДНК *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* в биоптатах аденоидовTable 1. The frequency of occurrence of DNA of *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* in adenoid biopsies

Год и количество обследованных детей Year and number of children examined	2016 г. N = 50		2017 г. N = 62		2016–2017 гг. N = 112	
	Количество Number	%	Количество Number	%	Количество Number	%
ДНК бактерий DNA of bacteria						
Не выявлено Not detected	5	10,0	3	4,8	8	7,14
<i>N. meningitidis</i>	1	2	0	–	1	0,9
<i>S. pneumoniae</i>	45	90	53	85	98	87,5
<i>H. influenzae</i>	4	8	15	24	19	16,96
<i>S. pyogenes</i>	16	32	26	42	42	37,5



- ДНК искоемых микроорганизмов не выявлены
DNA of the desired microorganisms was not detected
- ДНК *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*
DNA *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*
- ДНК *S. pneumoniae* + *H. influenzae* + *S. pyogenes*
DNA *S. pneumoniae* + *H. influenzae* + *S. pyogenes*
- ДНК *S. pneumoniae*
DNA *S. pneumoniae*
- ДНК *S. pyogenes*
DNA *S. pyogenes*
- ДНК *H. influenzae* + *S. pyogenes*
DNA *H. influenzae* + *S. pyogenes*
- ДНК *S. pneumoniae* + *H. influenzae*
DNA *S. pneumoniae* + *H. influenzae*
- ДНК *S. pneumoniae* + *S. pyogenes*
DNA *S. pneumoniae* + *S. pyogenes*

Рисунок. Удельный вес биоптатов аденоидов, содержащих ДНК детектируемых видов бактерий, как по отдельности, так и в комбинации между собой

Figure. The proportion of biopsy specimens of adenoids containing DNA of bacterial species under study, both individually and in combination with each other

ния выявления ДНК менингококка положительный образец был верифицирован с помощью протокола, рекомендованного ВОЗ для обнаружения *N. meningitidis* на основании выявления видового гена *sodC* [18]. Амплификация ДНК и визуализация результатов проводились на приборе «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия).

Серогруппирование *N. meningitidis* проводили с помощью ПЦР-праймеров для амплификации уникальных консервативных участков генов, кодирующих капсульные полисахариды серогрупп А, В, С, W-135, X, Y [18]. Данный метод позволяет определять генетически детерминированную способность к капсулообразованию, что является немаловажным, так как при носительстве способность к капсулообразованию у менингококков может фенотипически не проявляться [31].

Обнаружение ДНК *S. pyogenes* проводили с помощью набора реагентов Стрептопол-А-РВ (Литех, Россия) согласно инструкции к набору.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с определением стандартной ошибки (m) для экстенсивных показателей, доверительного коэффициента по Стьюденту (t). Достоверным считался результат при величине $t > 2$. Разность результатов считали статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты молекулярного тестирования биоптатов лимфоаденоидной ткани носоглотки от 112 детей представлены в таблице 1. ДНК хотя бы одного из четырех детектируемых видов микроорганизмов обнаружена в 104 образцах (92,86%), из них: ДНК менингококка — в одном образце (0,9%), пневмококка — в 98 (87,5%), гемофильной палочки — в 19 (16,96%), стрепто-

кокка группы А — в 42 (37,5%) образцах. Не найдено ни одного из указанных видов микроорганизмов лишь у 8 детей (7,14%).

S. pneumoniae, в отсутствие других исследуемых видов бактерий (рис.), был обнаружен в 54 образцах (48,2%), *S. pyogenes* — в 5 образцах (4,5%). Одновременно 2 вида искомым бактерий встречались в следующих сочетаниях: *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* — в 1 образце (0,9%), *S. pneumoniae* и *H. influenzae* — в 7 образцах (6,3%); *H. influenzae* и *S. pyogenes* — в 1 образце (0,9%); *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* — в 25 образцах (22,3%). Три вида бактерий — *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. pyogenes* — были одновременно выявлены у 11 пациентов (9,8%).

Проведенное серогруппирование менингококка не подтвердило его принадлежности ни к одной из 6 наиболее распространенных в мире серогрупп, ответственных за эпидемические подъемы заболеваемости (А, В, С, W-135, X, Y). Принадлежность к другим 6 известным серогруппам (Z, 29E, K, L, H, I) не определялась. Таким образом, выявленный менингококк принадлежит либо к редко встречающейся серогруппе, либо не содержит генов, кодирующих капсульные полисахариды, и является бескапсульным.

Проведен анализ распределения биоптатов лимфоаденоидной ткани детей, содержащих ДНК искомым микроорганизмов, в зависимости от клинического диагноза (табл. 2). В распределении биоптатов, содержащих ДНК *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* никаких особенностей не выявлено. Однако ДНК *S. pyogenes* чаще обнаруживалась в биоптатах от детей с диагнозом «Гипертрофия аденоидов и миндалин», как за весь период, так и по отдельным годам наблюдения.

Эта тенденция проявляется более существенно, если сгруппировать детей по возрасту. Так, большинство обследованных детей принадлежало к возрастной группе от 3 до 8 лет (96 человек, 85,7%), доля детей 1–2 и 9–12 лет составила 14,3% (16 человек). В выборке детей 3–8 лет с диагнозом «Гипертрофия аденоидов» доля биоптатов с ДНК-положительными пробами на *S. pyogenes* за весь период наблюдения составила 33,8% (25 человек из 74), а с диагнозом «Гипертрофия аденоидов и миндалин» — 50% (11 человек из 22). Это различие, по сравнению с данными для возрастов диапазона 1–12 лет, выглядит более значимым (табл. 3). Несмотря на то что выявленные различия были статистически не достоверными (33,8 и 50%, $p > 0,05$), прослеживается явная тенденция преобладания ДНК *S. pyogenes* в биоптатах аденоидов у детей с диагнозом «Гипертрофия аденоидов и миндалин» по сравнению с диагнозом «Гипертрофия аденоидов».

Таблица 2. Частота встречаемости ДНК *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* в биоптатах аденоидов в зависимости от клинического диагноза

Table 2. The frequency of occurrence of DNA of *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* in adenoid biopsies, depending on the clinical diagnosis

Год и количество обследованных детей Year and number of children examined	2016 г. N = 50		2017 г. N = 62		2016–2017 гг. N = 112			
	Гипертрофия/Hypertrophy							
	аденоидов adenoids n = 32	аденоидов и миндалин adenoids and tonsils n = 18	аденоидов adenoids n = 54	аденоидов и миндалин adenoids and tonsils n = 8	аденоидов adenoids n = 86	аденоидов и миндалин adenoids and tonsils n = 26		
Количество Number	%	Количество Number	%	Количество Number	%	Количество Number	%	
<i>N. meningitidis</i>	1	3,1	–	–	1	1,2	–	–
<i>S. pneumoniae</i>	28	87,5	46	85,2	74	86,1	24	92,3
<i>H. influenzae</i>	3	9,4	13	24,1	16	18,6	3	11,5
<i>S. pyogenes</i>	8	25,0	22	40,7	4	50,0	30	34,9
							12	46,1

Таблица 3. Частота встречаемости ДНК *S. pyogenes* в биоптатах аденоидов, полученных от детей возрастом от одного года до 12 лет и от 3 до 8 лет, в зависимости от клинического диагнозаTable 3. The frequency of occurrence of *S. pyogenes* DNA in adenoid biopsy specimens obtained from children aged from one to 12 years and from 3 to 8 years, depending on the clinical diagnosis

Период обследования Examination period	2016–2017 гг. Year of 2016–2017							
Возраст детей Age of children	от одного года до 12 лет from 1 to 12 years				от 3 до 8 лет from 3 to 8 years			
Количество детей Number of children	n = 112				n = 96			
Диагноз Diagnosis	Гипертрофия Hypertrophy							
	аденоидов adenoids n = 86		аденоидов и миндалин adenoids and tonsils n = 26		аденоидов adenoids n = 74		аденоидов и миндалин adenoids and tonsils n = 22	
	Количество Number	%	Количество Number	%	Количество Number	%	Количество Number	%
<i>S. pyogenes</i>	30	34,9%	12	46,1%	25	33,8%	11	50,0%

Обсуждение

Поводом к проведению данной работы послужила необходимость поиска оптимальной методологии для уточнения роли бактерионосителей *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. pyogenes* в эпидемическом процессе. Нами проведена оценка уровня носительства микроорганизмов, которые при определенных условиях могут вызывать заболевания с широким спектром клинических проявлений, в том числе, тяжелую инвазивную патологию. Об уровне носительства судили косвенно, по числу образцов клинического материала, в которых с помощью коммерческих наборов для ПЦР выявляли ДНК искомым бактерий. Само по себе обнаружение микробной ДНК не всегда свидетельствует о присутствии соответствующих бактерий в образце, так как ДНК может сохраняться в тканях и после элиминации живых особей под воздействием антимикробных препаратов или защитных механизмов организма хозяина. Поэтому ПЦР не позволяет со 100%-й вероятностью подтверждать носительство в момент обследования пациента, а также судить о его длительности. Положительные результаты ПЦР свидетельствуют только о том, что пациент являлся бактерионосителем либо на момент обследования, либо в течение какого-то времени до начала обследования.

В качестве исследуемого материала было решено использовать биоптаты аденоидов, полученных от детей, госпитализированных в клинику для плановой аденотомии. Из данных литературы следует, что в тканях гипертрофи-

рованных миндалин могут обнаруживаться множественные воспалительные локусы, в результате чего аденоидные вегетации, даже в отсутствии клинических признаков воспаления, становятся очагом аутоинфекции с возможностью генерализации инфекционного процесса [11].

Особое внимание в данной работе было привлечено к выявлению менингококков, поскольку именно они являются основными возбудителями ГБМ [4, 9]. Мы обнаружили ДНК менингококка лишь в одном из 112 образцов тканей аденоидов, то есть в изученной популяции детей уровень носительства менингококка в тканях аденоидов составил 0,9%. Много это или мало?

Greiner и соавт. [14], проверив с помощью ПЦР биоптаты аденоидов двух групп обследуемых — 26 человек от 2 до 36 лет из Оксфорда и 72 человек от 3 до 15 лет, проживавших в Цюрихе, обнаружили ДНК менингококка в первой группе в 53,8% случаев, во второй группе обследуемых ее не обнаружили вообще. Разброс полученных результатов оказался очень значительным. Для сравнения, по данным микробиологических и ПЦР-исследований материала из носоглотки, полученного от лиц разного возраста и проживающих в различных странах, уровень носительства менингококка также широко варьировал — от 1,3 до 36% [3, 11, 32]. Высокая вариабельность показателя распространенности носительства менингококка может быть связана с множеством факторов: используемым методом детекции, возрастом обследуемых, местом и временем года, в которое проводилось исследование, эпидемиологической ситуаци-

ей в регионе, составом изучаемых коллективов (здоровые добровольцы, призывники, паломники, дети после антибиотикотерапии при подготовке к плановой операции и т.д.). Таким образом, установленный нами уровень носительства менингококка (0,9%) вполне укладывается в общую статистику.

Существует мнение, что уровень менингококкового носительства коррелирует с частотой встречаемости генерализованных форм менингококковой инфекции в популяции [3, 22]. Исходя из результатов нашего исследования, уровень бактерионосительства соответствует межэпидемическому периоду менингококковой инфекции, наблюдаемому в г. Москве с 1991 г. Согласно данным Роспотребнадзора, в Москве показатели заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекции среди детей до 14 лет были низкими и составляли: в 2016 г. — 1,45, в 2017 г. — 1,7 на 100 тыс. детского населения (Форма Федерального статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»). При этом выявленный менингококк не принадлежал ни к одной из серогрупп (А, В, С, W135), определяющих заболеваемость генерализованными формами менингококковой инфекции в г. Москве [6].

Отдельного обсуждения заслуживает вопрос о патогенетической связи «здорового» носительства возбудителей ГБМ в носоглотке и генерализацией инфекционного процесса. В настоящее время общепринятой является теория гематогенного пути диссеминации возбудителя с последующим инфицированием мозговых оболочек. Однако в 2010 г. Sjolinder и Jonsson показали в эксперименте на трансгенных мышах, экспрессирующих один из рецепторов адгезии менингококка — человеческий белок CD46, что возбудитель способен попадать в оболочки мозга со слизистой оболочки носа по обонятельным нервам. Авторы подтверждают свое заключение на основании анализа клинически и бактериологически установленных случаев менингита без признаков бактериемии [27].

Немаловажно, что феномен проникновения в спинномозговую жидкость по обонятельным нервам выявлен и для пневмококка, а также для ряда вирусов [21]. В связи с этим настораживает высокий удельный вес носительства пневмококка (87,5%), установленный в нашем исследовании.

S. pneumoniae в настоящее время является одним из основных бактериальных патогенов человека. Среди детей в возрасте до 5 лет ежегодно в мире регистрируется около 15 млн случаев тяжелых пневмококковых заболеваний (включая пневмонию, менингит и сепсис), приводящих к летальному исходу приблизительно

в 500 тыс. случаев [23]. Известно, что в возникновении инвазивных форм пневмококковой инфекции наиболее существенное значение имеют 20 из 96 известных серотипов пневмококков [1]. В данной работе серотипирования пневмококков не проводилось. Однако предыдущие исследования, проведенные с нашим участием, показали, что большинство серотипов штаммов *S. pneumoniae* от носителей (90%) относятся к вирулентным, входящим в состав 13-валентной пневмококковой вакцины [10]. Следовательно, носители пневмококков являются резервуаром возбудителя и могут представлять опасность как для окружающих, так и для самих себя, с точки зрения развития аутоинфекции.

Бактериологическое исследование носоглоточной слизи показало, что около половины детей (как организованных, так и не организованных) являются носителями пневмококков [2]. Русецким Ю.Ю. и соавт. [11] с помощью бактериологического метода установлено, что при посеве слизи из носоглотки показатели микробной обсемененности оказываются достоверно ниже, чем при исследовании биоптатов аденоидной ткани. Это свидетельствует о возможной недооценке уровня бактериальной контаминации в случае применения традиционных методов обследования пациентов (мазок из носоглотки). При этом пневмококк являлся доминирующим видом в составе микрофлоры биоптатов аденоидов. Эти данные согласуются с результатами и нашей работы. Однако в нашем ПЦР-исследовании пневмококк выявлялся в ткани аденоидов у детей в 1,4 раза чаще, чем в работе Русецкого Ю.Ю. и соавт. [11].

Следует остановиться и на обнаруженной нами тенденции преобладания *S. pyogenes* в биоптатах аденоидов у детей с диагнозом «Гипертрофия аденоидов и миндалин» по сравнению с диагнозом «Гипертрофия аденоидов» (50,0% против 33,8%, $p > 0,05$). Судя по данным Ramirez и соавт. [24] и Lindroos [20], случаи сочетанной гипертрофии аденоидов и небных миндалин указывают на наличие у детей хронического рецидивирующего воспаления в рото- и носоглотке, в этиологии которого наибольшее значение имеют стрептококки группы А. Изолированная гипертрофия аденоидов чаще протекает без клинических признаков воспаления, с чем, по-видимому, и связана меньшая частота выделяемости *S. pyogenes*. Следует также отметить, что Ramirez и соавт. [24] обнаружили *S. pyogenes* в биоптатах аденоидной ткани в 2 раза чаще, чем в мазках из носоглотки.

Таким образом, нами подтверждена высокая информативность использования биоптатов аденоидов и ПЦР для изучения уровня носительства менингококка, пневмококка, ге-

мофильной палочки и стрептококка группы А. Данная методика позволяет с наибольшей полнотой выявлять в клиническом материале персистирующие микроорганизмы, в том числе, некультивируемые. В конечном итоге предложенный подход будет способствовать более точному определению уровня носительства изучаемых микроорганизмов и установлению момента его повышения. Исследование будет продолжено с увеличением количества обследуемых пациентов и расширения методических приемов.

В настоящем исследовании все случаи детекции менингококка и гемофильной палочки были связаны с одновременным выявлением пневмококка. Стрептококки группы А также в большинстве случаев обнаруживались вместе с пневмококками. На основании этих наблюдений можно выдвинуть предположение об отсутствии антагонизма между изучаемыми микроорганизмами. В то же время имеются данные о существовании естественного антагонизма между представителями нор-

мальной микробиоты и потенциально патогенными микроорганизмами (патобионтами) [19]. Носительство патобионтов можно расценивать как дисбиоз, развивающийся на фоне нарушения колонизационной резистентности. Следовательно, применение антибиотиков с целью санации бактерионосителей лишь усугубляет дисбиоз, а также способствует формированию лекарственной устойчивости патобионтов [7, 8, 12]. Восстановление состава микробиоты носоглотки с помощью пробиотиков, то есть резидентных бактерий, обитающих на слизистых оболочках человека в норме, позволит проводить элиминацию патобионтов «экологически щадящим» способом [16, 17]. Повысить терапевтическую эффективность пробиотиков возможно, к примеру, с помощью выращивания их в виде биопленок [30], а также — при использовании аутопробиотиков [28]. Такие подходы планируется применить в наших дальнейших исследованиях по санации носителей патобионтов, обитающих на слизистой оболочке носоглотки.

Список литературы/References

1. Баранов А., Брико Н., Намазова-Баранова Л., Ряпис Л. Стрептококки и пневмококки. Ростов-на-Дону: Феникс, 2013. 301 с. [Baranov A., Briko N., Namazova-Baranova L., Ryapis L. Streptococci and Pneumococci. *Rostov-on-Don: Foenix, 2013. 301 p. (In Russ.)*]
2. Бахарева Н.В., Протасова И.Н., Перьянова О.В., Кукушкина И.П., Мемнонова С.В., Коваль М.В. Бактерионосительство пневмококков среди детей города Красноярска // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 4. С. 73–77. [Bakhareva N.V., Protasova I.N., Peryanova O.V., Kukushkina I.P., Memnonova S.V., Koval' M.V. Streptococcus pneumoniae carriage in children of Krasnoyarsk city. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinoprophylaxis, 2012, no. 4, pp. 73–77. (In Russ.)*]
3. Королева И.С., Максина Т.А., Закроева И.М., Лыткина И.Н., Пяева А.П., Маликов В.Е., Соловьева Л.Я. Критерии значимости менингококкового носительства в очагах менингококковой инфекции // Медицинский алфавит. 2013. Т. 4, № 24. С. 31–33. [Koroleva I.S., Maksina T.A., Zakroeva I.M., Lytkina I.N., Pyaeva A.P., Malikov V.E., Solovieva L.A. Criteria for the importance of meningococcal carriage in meningococcal foci infections. *Meditinskiy Alfavit = Medical Alphabet, 2013, vol. 4, no. 24, pp. 31–33. (In Russ.)*]
4. Королева М.А., Покровский В.И., Миронов К.О., Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Белошицкий Г.В., Закроева И.М., Мельникова А.А., Кошкина Н.А., Королева И.С. Эпидемиологический мониторинг за гнойными бактериальными менингитами в историческом и современных аспектах // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 2. С. 73–79. [Koroleva M.A., Pokrovsky V.I., Mironov K.O., Platonov A.E., Shipulin G.A., Beloshitsky G.V., Zakroeva I.M., Melnikova A.A., Koshkina N.A., Koroleva I.S. Epidemiological monitoring of purulent bacterial meningitides: historical and present-day aspects. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues, 2014, no. 2, pp. 73–79. (In Russ.)*]
5. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. От безвредного носительства к гнойному бактериальному менингиту // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013. № 2. С. 46–52. [Kostykova N.N., Bekhalo V.A. From the carriage to purulent meningitis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues, 2013, no. 2, pp. 46–52. (In Russ.)*]
6. Миронов К.О. Клональные комплексы *Neisseria meningitidis*, циркулирующие на территории России, и их роль в эпидемическом процессе менингококковой инфекции // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. № 6. С. 52–61. [Mironov K.O. Clonal complex of *Neisseria meningitidis*, circulating in the regions of Russia and their role in epidemic process of meningococcal infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues, 2016, no. 6, pp. 52–61. (In Russ.)*]
7. Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83, № 1. С. 15–27. [Muliukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Mikrobiologiya = Microbiology, vol. 83, no. 1, pp. 15–27. (In Russ.)*]
8. Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире // Педиатрическая фармакология. 2017. Т. 14, № 5. С. 341–354. [Namazova-Baranova L.S., Baranov A.A. Antibiotic resistance in modern world. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology, 2017, vol. 14, no. 5, pp. 341–354. doi: 10.15690/pf.v14i5.1782 (In Russ.)*]

9. Покровский В.И., Фаворова Л.А., Костюкова Н.Н. Менингококковая инфекция. М.: Медицина, 1976. 272 с. [Pokrovskiy V.I., Favorova L.A., Kostyukova N.N. Meningococcal infection. Moscow: Medicine, 1976. 272 p. (In Russ.)]
10. Протасова И.Н., Перьянова О.В., Бахарева Н.В., Салмина А.Б., Рева И.В., Такано Т., Ивао Я., Ямамото Т., Сидоренко С.В., Мельников В.Г. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей города Красноярск // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 2. С. 144–148. [Protasova I.N., Peryanova O.V., Bakhareva N.V., Salmina A.B., Reva I.V., Takano T., Ivaoy Y., Yamamoto T., Sidorenko S.V., Melnikov V.G. Antimicrobial susceptibility of pediatric Streptococcus pneumoniae isolates in Krasnoyarsk. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, vol. 16, no. 2, pp. 144–148. (In Russ.)]
11. Русецкий Ю.Ю., Седых Т.К., Чернышенко И.О., Смирнова В.А. Сравнительное бактериологическое исследование микрофлоры поверхности и биоптатов миндалин у детей с патологией лимфоаденоидного глоточного кольца // Педиатрия. 2012. Т. 91, № 2. С. 52–56. [Rusetskiy Yu.Yu., Sedykh T.K., Chernyshenko I.O., Smirnova V.A. Comparative bacteriological study of surface microflora and tonsil biopsies in children with lymphadenoid pharyngeal ring pathology. *Pediatriya = Russian Pediatrics*, 2012, vol. 91, no. 2, pp. 52–56. (In Russ.)]
12. Чагина И.А., Борисова О.Ю., Мельников В.Г., Ивашинникова Г.А., Пименова А.С., Донских Е.Е., Кафарская Л.И., Алешкин В.А. Чувствительность штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к антибактериальным препаратам // Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. 2014. № 4. С. 8–13. [Chagina I.A., Borisova O.Iu., Mel'nikov V.G., Ivashinnikova G.A., Pimenova A.S., Donskikh E.E., Kafarskaia L.I., Aleshkin V.A. Sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae* strains to antibacterial preparations. *Zhurnal Mikrobiologii i Immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 4, pp. 8–13. (In Russ.)]
13. Blanchette-Cain K., Hinojosa C.A., Akula Suresh Babu R., Lizcano A., Gonzalez-Juarbe N., Munoz-Almagro C., Sanchez C.J., Bergman M.A., Orihuela C.J. Streptococcus pneumoniae biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization. *mBio*, 2013, vol. 4, no. 5: e00745-13. doi: 10.1128/mBio.00745-13
14. Greiner O., Berger C., Day P.J.R., Meier G., Tang C.M., Nadal D. Rates of detection of *Neisseria meningitidis* in tonsils differ in relation to local incidence of invasive disease. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 11, pp. 3917–3921. doi: 10.1128/JCM.40.11.3917-3921.2002
15. Johnston J.J., Douglas R. Adenotonsillar microbiome: an update. *Postgrad. Med. J.*, 2018, vol. 94, no. 1113, pp. 398–403. doi: 10.1136/postgradmedj-2018-135602
16. Kanmani P., Clua P., Vizoso Pinto M.G., Rodriguez C., Salva S., Alvarez S., Melnikov V., Kitazawa H., Villena J. Respiratory commensal bacteria *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* improves resistance of infant mice to respiratory syncytial virus and Streptococcus pneumoniae superinfection. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8: 1613. doi: 10.3389/fmicb.2017.01613
17. Kiryukhina N.V., Melnikov V.G., Suvorov A.V., Morozova Yu.A., Ilyin V.K. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 233–238. doi: 10.1007/s12602-013-9147-x
18. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *N. meningitidis*, *H. influenzae* and *S. pneumoniae*. WHO Manual, 2nd ed. WHO/IVB.11.09, 2011.
19. Krismer B., Weidenmaier C., Zipperer A., Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 11, pp. 675–687. doi: 10.1038/nrmicro.2017.104
20. Lindroos R. Bacteriology of the tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hyperplasia — a short review. *Acta Otolaryngol.*, 2000, suppl. 543, pp. 206–208.
21. Mori J., Nishiyama Y., Yokoshi N., Kimuri Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J. Neurovirol.*, 2005, vol. 11, pp. 129–137.
22. Neal K.R., Nguyen-Van-Tam J.S., Jeffrey N., Slack R.C., Madeley R.J., Ait-Tahar K., Job K., Wale M.C., Ala'Aldeen D.A. Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study. *BMJ*, 2000, vol. 320, no. 7238, pp. 846–849.
23. O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P., Henkle E., Deloria-Knoll M., McCall N., Lee E., Mulholland K., Levine O.S., Cherian T., Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 2009, vol. 374, pp. 893–902. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6
24. Ramirez A., Peidrola D., Lopez A., Martinez M.D., Ros M.J., Corral J.L., Arteaga E. Beta-hemolytic streptococci in tonsil hypertrophy and recurrent tonsillitis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 1997, vol. 15, no. 6, pp. 315–318.
25. Rizek C.F., Luiz A.M., Assis G.R., Costa S.F., Levin A.S., Lopez M.H. Comparison of methods to identify *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2016, vol. 58, no. 121112: 60.
26. Sim R.J., Harrison M.M., Moxon E.R., Tang C.M. Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet*, 2000, vol. 356, pp. 1653–1654.
27. Sjolinder H., Jonsson A.B. Olfactory nerve — a novel invasion route of *Neisseria meningitidis* to reach the meninges. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 11: e14034. doi: 10.1371/journal.pone.0014034
28. Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., Kondratenko Y., Lavrenova N., Korobeynikov A., Kozyrev P., Kramskaya T., Leontieva G., Kudryavtsev I., Guo D., Lapidus A. and Ermolenko E. Autoprobiotics as an approach for restoration of personalised microbiota. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9: 1869.
29. Tan S.Y., Chew S.C., Tan S.Y., Givskov M., Yang L. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, vol. 26, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.002
30. Villena J., Laino J., Suvorov A., Melnikov V.G., Alvarez S. Immunobiotic and recombinant lactic acid bacteria: soldiers in the fight against Streptococcus pneumoniae. *Recent Trends Immunol.*, 2015, 30 p. URL: <https://smjournals.com/ebooks/recent-trends-in-immunology/chapters/RTI-15-03.pdf>

31. Weber M.V., Claus H., Maiden M.C., Frosch M., Vogel U. Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-genes-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, vol. 296, no. 7, pp. 475–484.
32. Wilder-Smith A., Paton N.I., Barkham T.M., Earnest A. Meningococcal carriage in Umra pilgrims returning from Saudi Arabia. *J. Travel Med.*, 2003, vol. 10, no. 3, pp. 147–149.

Авторы:

Комбарова С.Ю., д.б.н., зам. директора по научной работе, руководитель лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Бичучер А.М., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Солдатский Ю.Л., д.м.н., профессор, зав. оториноларингологическим отделением ГБУЗ «Морозовская ДГКБ Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия;

Юнусова Р.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Скирда Т.А., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Мартыненко И.Г., научный сотрудник лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Головина Л.И., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Эдгем С.Р., к.м.н., врач-оториноларинголог ГБУЗ Морозовская ДГКБ Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Северин Т.В., врач-оториноларинголог ГБУЗ Морозовская ДГКБ Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Мельников В.Г., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории кокковых инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Kombarova S.Yu., PhD, MD (Biology), Deputy Director on Science, Head of Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Bichucher A.M., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Soldatsky Yu.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Otorhinolaryngology of Morozovskaya Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation;

Yunusova R.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Skirda T.A., PhD (Medicine), Principal Investigator, Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Martynenko I.G., Researcher, Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Golovina L.I., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Edgem S.R., PhD (Medicine), Otorhinolaryngologist, Morozovskaya Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation;

Severin T.V., Otorhinolaryngologist, Morozovskaya Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation;

Melnikov V.G., PhD (Medicine), Principal Investigator, Laboratory of Coccoid Infections of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СТРЕПТОКОККОВ И КЛЕБСИЕЛЛ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

Л.А. Краева^{1,2}, Е.С. Кунилова¹, О.А. Бургасова³, Г.Н. Хамдулаева¹,
Е.М. Данилова¹, Г.И. Беспалова⁴

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

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Наряду с известными возбудителями воспалительных процессов респираторного тракта в клинической практике часто встречаются представители стрептококков и клебсиелл, ранее считавшиеся комменсалами слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Обмен генетической информацией способствует передаче детерминант вирулентности между штаммами не только в пределах вида, но и рода. В таких случаях приобретение генов вирулентности от представителей патогенных видов способствует проявлению непатогенными стрептококками ранее не присущих им свойств. Поэтому целью исследования стало изучение вирулентности условно-патогенных стрептококков и клебсиелл при воспалительных процессах респираторного тракта и обоснование их этиологической роли в развитии заболеваний. Изучены 220 штаммов *Streptococcus* spp. и 97 штаммов *Klebsiella* spp., выделенных от пациентов с воспалительными процессами в респираторном тракте и от здоровых лиц. Стрептококки исследовали на наличие генов вирулентности *sagA*, *lmb*, *fap1*, *ply*, *lytA*. Штаммы *Klebsiella* spp. исследовали на наличие генов вирулентности *MrkD*, *magA*, *kfu*. Фенотипическим маркером экспрессии гена *lmb* у стрептококков и гена *MrkD* у клебсиелл служил показатель адгезии выделенных штаммов к клеткам буккального эпителия. Экспрессию гена *fap1* оценивали в фенотипическом тесте биопленкообразования. У лиц с воспалительными процессами верхних дыхательных путей наиболее часто присутствовали виды стрептококков: *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis*. Штаммы указанных видов, выделенные при воспалительных процессах в верхних дыхательных путях, обладали в 2–4 раза большей адгезивностью, чем штаммы, выделенные от здоровых лиц. Фенотипическое определение способности к биопленкообразованию показало, что штаммы стрептококков, содержащие ген *fap1*, формировали выраженную биопленку в отличие от штаммов, не имеющих гена *fap1*. Штаммы *K. oxytoca*, выделенные от людей с гайморитом, имели гены вирулентности *MrkD*, *magA*, *kfu*, которые характерны для штаммов *K. pneumoniae*. В фенотипических тестах

Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85. Факс: 8 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Contacts:

Lyudmila A. Kraeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85. Fax: +7 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Библиографическое описание:

Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н.,
Данилова Е.М., Беспалова Г.И. Значение факторов патогенности
некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении
их этиологической роли в развитии воспалительных процессов
респираторного тракта // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1.
С. 121–128. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1339

Citation:

Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M.,
Bespalova G.I. The importance of pathogenicity factors of some
Streptococcus spp. and *Klebsiella* spp. in determining their etiological role
in the inflammatory processes of the respiratory tract // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1,
pp. 121–128. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1339

установлено, что значение индекса адгезии у штаммов *K. oxytoca*, выделенных от больных, в 4 раза выше, чем у штаммов этого вида, выделенных от здоровых лиц. Таким образом, для подтверждения этиологической роли условно-патогенного микроорганизма в развитии инфекционного процесса необходимо руководствоваться данными о генетических и фенотипических маркерах вирулентности выделенного штамма.

Ключевые слова: факторы патогенности, стрептококки, клебсиеллы, генетические и фенотипические маркеры вирулентности.

THE IMPORTANCE OF PATHOGENICITY FACTORS OF SOME *STREPTOCOCCUS* spp. AND *KLEBSIELLA* spp. IN DETERMINING THEIR ETIOLOGICAL ROLE IN THE INFLAMMATORY PROCESSES OF THE RESPIRATORY TRACT

Kraeva L.A.^{a,b}, Kunilova E.S.^a, Burgasova O.A.^c, Hamdulaeva G.N.^a, Danilova E.M.^a, Bespalova G.I.^d

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

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

^c RUDN University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Together with the known pathogens of inflammatory processes of the respiratory tract in clinical practice are often found representatives of *Streptococcus* and *Klebsiella*, previously considered commensals of the mucous membranes of the upper respiratory tract. The exchange of genetic information facilitates the transfer of virulence factors between strains not only within the species but also within the genus. In such cases, the acquisition of virulence genes by non-pathogenic species from representatives of pathogenic species contributes to the manifestation of previously not typical properties. Therefore, the aim of the research was to study the virulence of opportunistic *Streptococcus* spp. and *Klebsiella* spp. in inflammatory processes of the respiratory tract and substantiate their etiological role in the development of the disease. We studied 220 strains of *Streptococcus* spp. and 97 strains of *Klebsiella* spp., isolated from patients with inflammatory processes in the respiratory tract and from healthy individuals. Strains of *Streptococcus* spp. were investigated for the presence of virulence genes: *sagA*, *lmb*, *fapI*, *ply*, *lytA*. Strains of *Klebsiella* spp. were examined for the presence of virulence genes: *MrkD*, *magA*, *kfu*. The phenotypic marker of *lmb* gene expression in *Streptococcus* and *MrkD* gene in *Klebsiella* was the indicator of adhesion of isolated strains to buccal epithelial cells. Expression of the *fapI* gene was evaluated in a phenotypic biofilm formation test. In individuals with upper respiratory tract inflammation, the most common types of streptococci were: *S. mitis*, *S. anginosus*, and *S. oralis*. Strains of these species isolated from inflammatory processes in the upper respiratory tract had 2–4 times greater adhesiveness than strains isolated from healthy individuals. Phenotypic determination of the ability to biofilm formation showed that strains of *Streptococcus* containing the *fapI* gene formed a dense biofilm in contrast to strains without the *fapI* gene. *K. oxytoca* strains isolated from people with sinusitis had *mrkd*, *magA*, and *kfu* virulence genes that are characteristic of *K. pneumoniae* strains. In phenotypic tests, it was found that the value of the adhesion index in *K. oxytoca* strains isolated from patients is 4 times higher than in strains of this species isolated from healthy individuals. Thus, to confirm the etiological role of an opportunistic microorganism in the development of the infectious process, it is necessary to be guided by data on the genetic and phenotypic markers of virulence of the isolated strain.

Key words: pathogenicity factors, *Streptococcus*, *Klebsiella*, genetic and phenotypic markers of virulence.

Введение

Наибольшие затруднения в определении этиологической роли выделенных бактерий возникают при диагностике инфекционной патологии дыхательных путей в случае нахождения в исследуемом материале условно-патогенных микроорганизмов. В большей части таких случаев возбудитель инфекции остается неизвестным, так как выделяемые условно-патогенные бактерии не подлежат этиологическому учету из-за видовой принадлежности [28]. Не получая достоверной информации об истинном возбудителе заболевания и его основных биологических свойствах, лечащий врач делает назначения не этиологического, а патогенетического характера. Результатом такого подхода может быть неадекватная и не всегда успешная терапия.

По данным ряда исследователей возбудителями воспалительных процессов респираторного тракта чаще всего являются бактерии: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus (pneumoniae, pyogenes)*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* [2, 4, 5]. Соотношение видов варьирует при различных нозологиях, в различных регионах, у стационарных или амбулаторных больных. Этиологическая роль перечисленных бактерий не вызывает сомнений в силу принадлежности к видам, характеризующимся наличием целого ряда факторов патогенности. Так, среди стрептококков наибольшим количеством известных генов вирулентности обладают *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* [6, 8, 29, 33]. На основе сравнений последовательностей генов 16S рРНК все стрептококки условно разделены на 6 групп (*Anginosus*, *Bovis*,

Mitis, Mutans, Pyogenic, Salivarius) и два вида, пока не включенных в какую-либо группу: *S. entericus*, *S. pluranimalium* [33]. Представители видов *S. pyogenes* и *S. agalactiae* входят в группу Pyogenic, а *S. pneumoniae* — в группу Mitis [24]. И если представители группы Pyogenic имеют значительные генетические различия между собой, то некоторые стрептококки группы Mitis, в частности *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, имеют более 99% гомологии по анализу гена 16S рНК [15]. Несмотря на тесные генетические связи между этими видами, *S. pneumoniae* может быть опасным патогеном, а *S. oralis* и *S. mitis* обычно являются комменсальными микроорганизмами слизистых оболочек. Однако в некоторых случаях они способны вызывать оппортунистические заболевания у иммунокомпрометированных больных, особенно при замене клапанов сердца, пересадке органов или у онкологических больных [7, 14, 27]. Представители группы Mitis естественно трансформируемы, что позволяет осуществлять обмен генетической информацией между видами путем гомологичной рекомбинации [17, 30]. Именно по этой причине увеличение резистентности к пенициллину в популяции пневмококков было связано с формированием измененных вариантов пенициллинсвязывающих белков в результате приобретения штаммами генов резистентности к пенициллину от *S. mitis* и *S. oralis* [12]. Отмечены также гомологичные рекомбинации с родственными видами в генах пневмококковой вирулентности, кодирующих протеазу IgA и нейраминидазу А (*nanA*) [25], а гомологи факторов пневмококковой вирулентности, таких как пневмолизин (*Ply*) и аутолизин А (*LytA*), были идентифицированы в родственных видах группы Mitis [21, 32, 36]. Особого внимания заслуживает исследование штаммов стрептококков группы Mitis на наличие пневмолизина, ответственного за инвазивные свойства бактерий, и приводящего к распространению инфекции в организме человека [18, 22].

Наличие у штаммов *S. pyogenes* и *S. agalactiae* большого количества нехромосомных генетических элементов способствует горизонтальному переносу генов вирулентности не только между представителями одного вида, но и представителями разных видов [31]. Так, ген вирулентности *lmb*, который кодирует ламинин-связывающий белок, может быть передан родственным штаммам стрептококков с помощью транспозона или «острова» патогенности [13, 16]. В то же время гены стрептококков, постоянных резидентов ротовой полости, ответственные за образование биопленок, могут способствовать закреплению бактерий в местах локализации или дальнейшему их распространению в организме человека, что особенно важно при наличии у штаммов других факторов патогенности [34].

Так, экспериментальные исследования показали, что *fap1*, высокомолекулярный гликопротеин, имеет важное значение для длительного формирования фимбрий и образования биопленок у стрептококков ротовой полости [37].

Приобретение генов вирулентности от представителей патогенных видов способствует проявлению непатогенными стрептококками ранее не присущих им свойств. Так, основным фактором вирулентности у штаммов *S. pyogenes* является белок М, который появляется в виде волосовидных выступов на поверхности клеток. Он придает устойчивость бактериям к комплемент-опосредованному уничтожению полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами, тем самым защищая бактерии от фагоцитоза. Белок М также вызывает агрегацию стрептококков во время адгезии к клеткам тонзиллярного эпителия, поэтому он также может играть важную роль в инициации колонизации слизистой оболочки дыхательных путей [11]. Исследования *in vitro* показали непосредственное участие локуса *sagA* в реализации прикрепления бактериальной клетки к клеткам слизистого эпителия [26]. Однако недостаточное количество клинических данных не позволяют сделать однозначную оценку этих наблюдений.

Как известно, бактерии рода *Klebsiella* находят на слизистых оболочках носоглотки здоровых людей в 1–6% случаев, однако при различных заболеваниях респираторного тракта частота их выделения возрастает от 10% при синуситах до 29% при вентилятор-ассоциированных пневмониях [23]. При этом определяющее значение в развитии инфекционного процесса имеет резистентность штаммов к антибактериальным препаратам. Однако крайне важным также является наличие у бактерий рода *Klebsiella* ряда факторов патогенности. На пусковом этапе патогенеза заболевания наибольшее значение имеют факторы, определяющие взаимодействие бактерий с эпителиальными клетками входных ворот, — различные адгезины. Один из них — ген *MrkD*, который кодирует тип 3 фимбриальных адгезинов, обеспечивающих прикрепление клебсиелл к целому ряду тканей человека [10, 19]. В развитии инфекционного процесса, обусловленного клебсиеллами, большое значение имеет наличие у бактерий капсулы, защищающей их от фагоцитоза и бактерицидных факторов макроорганизма. Рядом исследователей был изучен ассоциированный антиген капсульных штаммов *K. pneumoniae* и ген, кодирующий его, — *magA*. Этот ген был выявлен у определенных серотипов *K. pneumoniae* [35]. Он может служить маркером вирулентности, так как при удалении гена *magA* путем направленных мутаций штаммы не вызывали поражений у экспериментальных

животных [9]. Клебсиеллы, как и большинство других бактерий, нуждаются в ионах железа, которое является для них важнейшим элементом, участвуя в переносе электронов и являясь кофактором синтеза нуклеиновых кислот. Бактерии приобретают ионы железа путем синтеза и секреции сидерофоров или гемофоров для захвата железа или гема, а также с помощью специализированных рецепторов внешней мембраны для транспортировки железа. При этом ключевую роль играет ген, отвечающий за связывание железа, — *kfu*. Являясь маркером вирулентности, этот ген часто присутствует у штаммов *K. pneumoniae*. Однако последние исследования показали, что его могут иметь также штаммы *Klebsiella oxytoca*, выделенные от больных людей и животных [20]. Таким образом, вполне очевиден недостаток информации о способности некоторых видов стрептококков и клебсиелл вызывать воспалительные процессы в респираторном тракте.

Цель исследования: дать характеристику вирулентности условно-патогенных бактерий при инфекционной патологии дыхательных путей и усовершенствовать методику этиологической расшифровки возбудителей.

Материалы и методы

Изучены 220 штаммов *Streptococcus* spp. (105 штаммов, выделенных из отделяемого верхних дыхательных путей лиц с воспалительными процессами верхнего респираторного тракта (фарингит, тонзиллит, ларингит), и 115 штаммов, выделенных от здоровых лиц (контрольная группа); 97 штаммов *Klebsiella* spp., выделенных от лиц с синуситом (преимущественно гайморит), и 28 штаммов, выделенных от здоровых лиц. В исследование были включены только те случаи, когда из биопробы не были выделены патогенные микроорганизмы, а условно-патогенные — лишь один вид в количестве не менее 1×10^5 КОЕ/мл.

В работе были использованы следующие методы исследования: бактериологические методы выделения микроорганизмов из клинического материала; методы выявления фенотипических маркеров вирулентности; методы выявления генотипических маркеров вирулентности; математические методы обработки данных.

Стрептококки исследовали на наличие следующих генов:

- ген *sagA* — 1-й ген в *sag*-локусе из 9 генов, которые необходимы стрептококку для продукции стрептолизина S. Он также участвует в транскрипции гена *emm*, который кодирует выработку белка М. Наличие этого гена характерно для штаммов *S. pyogenes*;

- ген *lmb*, регулирующий выработку протеина, являющегося составной частью адгезивных гликопротеинов стрептококков группы В;

- ген *fap1*, кодирующий выработку одного из адгезинов, которые участвуют в биопленкообразовании;

- ген *ply*, ответственный за выработку токсина — пневмолизина, характерного для *S. pneumoniae*;

- ген *lytA* — ген конъюгативной плазмиды пневмококков, кодирующий выработку пневмококкового аутолизина.

Штаммы *Klebsiella* spp. исследовали на наличие следующих генов:

- ген *MrkD*, кодирующий тип 3 фимбриальных адгезинов, обеспечивающих прикрепление клебсиелл к целому ряду тканей человека;

- ген *magA*, ассоциированный антиген капсульных штаммов *K. pneumoniae*;

- ген *kfu*, отвечающий за связывание железа, некротические изменения тканей.

Фенотипическим маркером экспрессии гена *lmb* у стрептококков и гена *MrkD* у клебсиелл служил показатель адгезии выделенных штаммов к клеткам букального эпителия [2]. Индекс адгезии рассчитывали по формуле: $ИА = АКБ_{50}/50Э$, где: ИА — индекс адгезии, АКБ₅₀ — количество клеток бактерий, прикрепившихся к 50 эпителиоцитам, 50Э — 50 изученных эпителиоцитов.

Экспрессию гена *fap1* оценивали в фенотипическом тесте биопленкообразования. Для этого на предметное стекло наносили каплю объемом 200 мкл, содержащую 1×10^5 КОЕ/мл штамма исследуемого стрептококка в бульоне Мюллера–Хинтона. Стекло размещали в чашке Петри, создав условия «влажной камеры», и оставляли в термостате при 37°C на 48 ч. Затем фиксировали образовавшуюся биопленку 4%-ным раствором параформальдегида 20 мин при 4°C. Удаляли фиксирующий раствор и наносили каплю красителя Дапи (1:1000) на 30 мин, смывали физиологическим раствором и проводили микроскопию с помощью люминесцентного микроскопа Axio Scope A1 (производства «Zeiss») при увеличении в 630 раз и профессиональной стационарной цифровой фотокамеры AxioCam HRc Rev3.

Результаты

При исследовании стрептококков оказалось, что от здоровых лиц было выделено 22 вида, в то время как от лиц с воспалительными процессами — всего 11 видов стрептококков. Среди них наибольшую долю составляли *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* наряду с *S. agalactiae* и *S. pneumoniae*.

В таблице 1 представлена частота выявления генов вирулентности у штаммов трех наиболее часто встречающихся видов стрептококков. В ряде случаев отмечалось сочетание в одном штамме нескольких генов. Причем, штаммы, выделенные от здоровых лиц, имели меньше генов вирулентности как по количеству, так и по их сочетанию. Наибольшим набором генов вирулентности обладали штаммы *S. mitis*, выделенные от больных с фарингитом как в острой, так и в хронической форме заболеваний.

Индекс адгезии у штаммов, выделенных от больных, был в 2–4 раза выше, чем у штаммов, выделенных от здоровых лиц (табл. 2).

Штаммы *S. anginosus*, выделенные при воспалительных процессах в верхних дыхательных путях, обладали в 3 раза большей адгезивностью, чем штаммы того же вида, выделенные от здоровых лиц. Штаммы *S. oralis*, выделенные от лиц с тонзиллитами, были в 2,5 раза более адгезивными, чем штаммы от здоровых лиц.

Фенотипическое определение способности к биопленкообразованию показало, что штаммы стрептококков, содержащие ген *fap1*, формировали выраженную биопленку в отличие от штаммов, не имеющих гена *fap1* (рис., III обложка).

Штаммы *K. oxytoca*, выделенные от лиц с воспалительными процессами, так же как и штаммы *K. pneumoniae*, содержали гены вирулентности (табл. 3).

При этом, штаммы *K. oxytoca*, выделенные от людей с гайморитом, имели гены вирулентности *MrkD*, *magA*, *kfu*, которые характерны для штаммов *K. pneumoniae* (табл. 4).

В фенотипических тестах установлено, что индекс адгезии у штаммов *K. oxytoca*, выделенных от больных, в 4 раза выше, чем у штаммов этого вида, выделенных от здоровых лиц. Так, штаммы *K. oxytoca*, выделенные от лиц с гайморитом, имели индекс адгезии $20,75 \pm 6,4$, в то время, как у штаммов, выделенных от здоровых лиц, он был равен $5,6 \pm 1,1$.

Обсуждение

Пейзаж видов стрептококков, выделенных от лиц с воспалительными процессами верхних дыхательных путей, отличался более узким спектром видов стрептококков, чем у здоровых лиц. Кроме того, от лиц с заболеваниями, наряду с *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*, были выделены *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* и в единичных случаях *S. dysgalactiae*, *S. intermedius*, *S. mutans*, *S. salivarius*. Если 3 первых вида давно известны своей причастностью к развитию воспалительных процессов в силу наличия большого набора факторов патогенности, то остальные виды все еще продолжают считаться комменсалами или условно-патогенными микро-

Таблица 1. Частота встречаемости генов вирулентности среди штаммов *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* при различных состояниях обследуемых

Table 1. The frequency of occurrence of virulence genes among strains *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* in different status of the examined patient

Стрептококки <i>Streptococcus</i>	Диагноз Diagnosis	Гены вирулентности Virulence genes				
		<i>sagA</i>	<i>lmb</i>	<i>fap1</i>	<i>ply</i>	<i>lytA</i>
<i>S. mitis</i>						
n = 28	Больные Patients	3	4	4	1	1
n = 25	Здоровые Healthy	–	1	1	–	–
<i>S. anginosus</i>						
n = 17	Больные Patients	–	2	3	1	–
n = 4	Здоровые Healthy	–	–	1	–	–
<i>S. oralis</i>						
n = 16	Больные Patients	–	2	2	3	4
n = 8	Здоровые Healthy	–	1	2	–	–

Таблица 2. Адгезивная активность штаммов *Streptococcus* spp. с наличием гена *lmb* по отношению к клеткам буккального эпителия

Table 2. Adhesive activity of strains of *Streptococcus* spp. with the presence of the *lmb* gene to buccal epithelial cells

Стрептококки <i>Streptococcus</i> spp.	Индекс адгезии штаммов, M±m The adhesion index of strains, M±m	
	Здоровые Healthy	Больные Patients
<i>S. mitis</i>	4,5±0,6	8,2±0,7
<i>S. anginosus</i>	3,3±0,3	11,1±1,2
<i>S. oralis</i>	2,8±0,2	6,10±0,9

Таблица 3. Частота встречаемости генов вирулентности у штаммов *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*

Table 3. Incidence of virulence genes in *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains

<i>Klebsiella</i> spp.	Доля штаммов <i>Klebsiella</i> spp., несущих гены вирулентности, % The proportion of strains of <i>Klebsiella</i> spp., carrying virulence genes, %		
	<i>MrkD</i>	<i>magA</i>	<i>kfu</i>
<i>K. pneumoniae</i>	35,4	40,2	23,2
<i>K. oxytoca</i>	20,9	37,2	23,3

Таблица 4. Частота встречаемости генов вирулентности у штаммов *K. oxytoca*Table 4. Incidence of virulence genes in *K. oxytoca* strains

Группы обследованных Investigated groups	Доля штаммов <i>K. oxytoca</i> , несущих гены вирулентности, % Proportion of <i>K. oxytoca</i> strains carrying virulence genes, %		
	<i>MrkD</i>	<i>magA</i>	<i>kfu</i>
Гайморит Maxillary sinusitis	61,3	25,8	32,3
Здоровые лица Healthy people	16,7	0	8,3

организмами. Именно частое обнаружение *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* у больных с воспалительными процессами в верхних дыхательных путях послужило причиной изучения у них факторов патогенности.

По результатам исследования генетических маркеров вирулентности штаммы *S. mitis*, выделенные от больных лиц, обладали наибольшим набором изучаемых генов, в том числе гена *sagA*, принимающего участие в выработке стрептолизина. В то же время у этого вида стрептококков при выделении от больных присутствовали гены, отвечающие за адгезивную активность и способность к биопленкообразованию. Очевидно, именно эти факторы способствовали хронизации инфекции у больных лиц, что подтверждалось выделением их от больных с хроническим фарингитом и тонзиллитом.

В результате исследования фенотипических маркеров адгезивности было выявлено, что штаммы изучаемых видов стрептококков, выделенные от лиц с воспалительными процессами респираторного тракта, были более адгезивными, чем штаммы тех же видов, выделенные от здоровых лиц. По-видимому тесные генетические связи между стрептококками *S. pneumoniae*, *S. mitis* и *S. oralis*, описанные ранее, дают возможность близкородственным микроорганизмам иметь сходные факторы патогенности.

Такое же соответствие наблюдалось при изучении фенотипических маркеров биопленкообразования: штаммы стрептококков, выделенные от больных лиц, несущие гены, отвечающие за способность к образованию биопленок, формировали ее подобно патогенным видам стрептококков. Как видно из фотографий био-

пленок, их плотность примерно одинакова у штаммов патогенных и условно-патогенных видов стрептококков, выделенных в одинаковых условиях. Поскольку масштабные исследования по выявлению различных факторов патогенности у этих видов стрептококков, выделенных от больных и здоровых лиц, ранее не проводились, то единичные такие находки ранее рассматривались как случайность [3].

При изучении штаммов клебсиелл, выделенных в исследовании, обращает на себя внимание тот факт, что при воспалительных процессах верхних дыхательных путей чаще выделялся вид *K. pneumoniae*, реже — *K. oxytoca*. Гены вирулентности, отвечающие за адгезивную активность, также чаще встречались у штаммов *K. pneumoniae*, в то время как гены, отвечающие за формирование капсулы и связывание железа в среде, были почти с одинаковой частотой представлены у микроорганизмов обоих видов.

Однако при детальном изучении факторов патогенности штаммов *K. oxytoca* выявлено, что этот вид чаще всего встречается при гайморитах и характеризуется наличием нескольких маркеров вирулентности. В то же время от здоровых лиц не было выделено штаммов с геном *magA*, участвующим в капсулообразовании; редко встречались штаммы, несущие гены *magA* и *kfu*, отвечающие за адгезию и перенос железа в бактериальную клетку. Более того, в фенотипических тестах была подтверждена экспрессия гена *magA* именно у штаммов *K. oxytoca*, выделенных от больных лиц. Собранные факты подтверждают важность изучения факторов патогенности у бактерий, относящихся к группе условно-патогенных, а не обоснования результатов бактериологического исследования только на принадлежности выделенного микроорганизма к патогенному виду.

Заключение

Для подтверждения этиологической роли условно-патогенного микроорганизма в развитии инфекционного процесса необходимо руководствоваться данными о генетических и фенотипических маркерах вирулентности выделенного штамма. Это поможет назначить адекватную терапию на ранних этапах инфекционного процесса и предотвратить развитие осложнений.

Список литературы/References

1. Барлетт Д.Д. Инфекции дыхательных путей: пер. с англ. М.: Бином, 2000. 192 с. [Bartlett D.D. Respiratory tract infections. Moscow: Binom, 2000. 192 p. (In Russ.)]
2. Благонравова А.С., Афонин А.Н., Воробьева О.Н., Широкова И.Ю. Сравнительный анализ адгезивности микроорганизмов, выделенных от больных и с объектов внешней среды лечебно-профилактических учреждений // Медицинский альманах. 2011. № 5 (18). С. 215–218. [Blagonravova A.S., Afonin A.N., Vorobyeva O.N., Shirokova I.Yu. Comparative analysis of the adhesion of microorganisms isolated from patients and from the objects of the external environment of medical institutions. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2011, no. 5 (18), pp. 215–218. (In Russ.)]

3. Бургасова О.А., Краева Л.А., Петрова И.С., Келли Е.И. Случай тяжелого течения смешанной респираторно-вирусной инфекции (грипп А (H1N1) + RS-вирусная), осложненной внебольничной пневмонией, вызванной *Streptococcus equi* // Инфекционные болезни. 2015. Т. 13, № 1. С. 71–74. [Burgasova O.A., Kraeva L.A., Petrova I.S., Kelly E.I. Case of severe course of mixed respiratory viral infection (influenza A (H1N1) + RS-viral) complicated by community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus equi*. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 71–74. (In Russ.)]
4. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. 39 с. [Laboratory diagnosis of community-acquired pneumonia: Guidelines. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2014. 39 p. (In Russ.)]
5. Перцева Т.А., Плеханова О.В., Дмитриченко В.В. Клинически значимые возбудители инфекций дыхательных путей: конспект врача-клинициста и микробиолога. Часть 3: Гемофила. Моракселла // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. 2007. № 6 (1). С. 15–20. [Pertseva T.A., Plekhanova O.V., Dmitrichenko V.V. Clinically significant pathogens of respiratory tract infections: abstract of Clinician and microbiologist. Part 3: Hemophila. Moraxella. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya = Clinical Immunology. Allergology. Infectology*, 2007, no. 6 (1), pp. 15–20. (In Russ.)]
6. Тоголян А.А., Суворов А.Н., Дмитриев А.В. Стрептококки группы В в патологии человека. СПб.: Человек, 2010. 212 с. [Totolyan A.A., Suvorov A.N., Dmitriev A.V. Group B Streptococcus in human pathology. St. Petersburg: Chelovek, 2010. 212 p. (In Russ.)]
7. Beighton D., Carr A.D., Oppenheim B.A. Identification of viridans Streptococci associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. *J. Med. Microbiol.*, 1994, no. 40, pp. 202–204. doi: 10.1099/00222615-40-3-202
8. Benton A.H., Marquart M.E. The role of pneumococcal virulence factors in ocular infectious diseases. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2018: 2525173. doi: 10.1155/2018/2525173
9. Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebize R., Diancourt L., Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization, 2009. *PLoS One*, no. 4 (3): e4982. doi: 10.1371/journal.pone.0004982
10. Brisse S., Grimont F., Grimont P.A.D. The genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*, 2006, no. 6, pp. 159–196. doi: 10.1007/0-387-30746-x_8
11. Caparon M.G., Stephens D.S., Olsen A., Scott J.R. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 1991, no. 59, pp. 1811–1817.
12. Chi F., Nolte O., Bergmann C., Ip M., Hakenbeck R. Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic pbp2xin *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007, no. 297, pp. 503–512. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.02.009
13. Dmitriev A., Shakleina E., Tkacikova L. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B Streptococci. *Folia Microbiol.*, 2002, vol. 47, pp. 291–295. doi: 10.1007/bf02817655
14. Douglas C.W., Heath J., Hampton K.K., Preston F.E. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.*, 1993, no. 39, pp. 179–182. doi: 10.1099/00222615-39-3-179
15. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, no. 15, pp. 613–630. doi: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002
16. Franken C., Haase G., Brandt C. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing scpB and lmb. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 41, pp. 925–935. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02563.x
17. Havarstein L.S., Gaustad P., Nes I.F., Morrison D.A. Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.*, 1996, no. 21, pp. 863–869. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.521416.x
18. Hirst R.A., Cosai B., Rutman A., Guerin C.J., Nicotera P., Andrew P.W., O'Callaghan C. *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.*, 2008, no. 197, pp. 744–751. doi: 10.1086/527322
19. Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun.*, 1992, no. 60, pp. 1577–1588.
20. Hossain S., De Silva B.C.J., Dahanayake P.S., Heo G.J. Phylogenetic relationships, virulence and antimicrobial resistance properties of *Klebsiella* sp. isolated from pet turtles in Korea. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2020, vol. 70, iss. 2, pp. 71–78. doi: 10.1111/lam.13245
21. Jefferies J., Nieminen L., Kirkham L.A., Johnston C., Smith A., Mitchell T.J. Identification of a secreted cholesterol-dependent cytolysin (mitilysin) from *Streptococcus mitis*. *J. Bacteriol.*, 2007, no. 189, pp. 627–632. doi: 10.1128/JB.01092-06
22. Jounblat R., Kadioglu A., Mitchell T.J., Andrew P.W. Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect. Immun.*, 2003, no. 71, pp. 1813–1819. doi: 10.1128/IAI.71.4.1813-1819.2003
23. Khilnani G.C., Dubey D., Hadda V., Sahu S.R., Sood S., Madan K., Tiwari P., Mittal S., Mohan A., Pandey R.M., Guleria R. Predictors and microbiology of ventilator-associated pneumonia among patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Lung India*, 2019, vol. 36, no. 6, pp. 506–511. doi: 10.4103/lungindia.lungindia_13_19
24. Kilian M., Poulsen K., Blomqvist T., H avarstein L.S., Bek-Thomsen M., Tettelin H., Sorensen U.B.S. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One*, vol. 3, iss. 7: e2683. doi: 10.1371/journal.pone.0002683
25. King S.J., Whatmore A.M., Dowson C.G. NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J. Bacteriol.*, 2005, no. 187, pp. 5376–5386. doi: 10.1128/JB.187.15.5376-5386.2005
26. Li Z., Sledjeski D.D., Kreikemeyer B., Podbielski A., Boyle M.D. Identification of pel, a *Streptococcus pyogenes* locus that affects both surface and secreted proteins. *J. Bacteriol.*, 1999, no. 181, pp. 6019–6027.
27. Lucas V.S., Beighton D., Roberts G.J., Challacombe S.J. Changes in the oral streptococcal flora of children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *J. Infect.*, 1997, no. 35, pp. 135–141. doi: 10.1016/S0163-4453(97)91545-0
28. Marrie T.J., Peeling R.W., Fine M.J. Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. *Am. J. Med.*, 1996, vol. 101, pp. 508–515. doi: 10.1016/S0002-9343(96)00255-0

29. Marrie T.J., Tirrel G.J., Majumbar S.R., Eurich D. Risk factors for pneumococcal endocarditi. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 37, no. 2, pp. 277–280. doi: 10.1007/s10096-017-3128-z
30. Morrison, D.A. Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. *Microb. Drug Resist.*, 1997, no. 3, pp. 27–37. doi: 10.1089/mdr.1997.3.27
31. Nakagawa I., Kurokawa K., Yamashita A. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res.*, 2003, vol. 13, no. 6A, pp. 1042–1055.
32. Neeleman C., Klaassen C.H., Klomberg D.M., de Valk H.A., Mouton J.W. Pneumolysin is a key factor in misidentification of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and is a putative virulence factor of *S. mitis* and other streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, no. 42, pp. 4355–4357. doi: 10.1128/JCM.42.9.4355-4357.2004
33. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2009, vol. 73, no. 3, pp. 407–450. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.
34. Potera C. Foraging a link between biofilms and disease. *Science*, 1999, no. 283, pp. 1837–1839. doi: 10.1126/science.283.5409.1837
35. Struve C., Bojer M., Nielsen E.M., Hansen D.S., Krogfelt K.A. Investigation of the putative virulence gene magA in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: magA is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. *J. Med. Microbiol.*, 2005, no. 54, pp. 1111–1113. doi: 10.1099/jmm.0.46165-0
36. Whatmore A.M., Efstratiou A., Pickerill A.P., Broughton K., Woodard G., Sturgeon D., George R., Dowson C.G. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of “atypical” pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.*, 2000, no. 68, pp. 1374–1382. doi: 10.1128/iai.68.3.1374-1382.2000
37. Wu H., Mintz K.P., Ladha M., Fives-Taylor P.M. Isolation and characterization of Fap1, a fimbriae-associated adhesin of *Streptococcus parasanguis* FW213. *Mol. Microbiol.*, 1998, no. 28 (3), pp. 487–500. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00805.x

Авторы:

Краева Л.А., д.м.н., доцент, зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;
Кунилова Е.С., младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Бургасова О.А., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;
Хамдулаева Г.Н., младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Данилова Е.М., врач-педиатр высшей категории, зав. поликлиническим отделением медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Беспалова Г.И., к.б.н., доцент кафедры микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kraeva L.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Microbiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation;
Kunilova E.S., Junior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Burgasova O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases with Courses in Epidemiology and Phthisiology RUDN University, Moscow, Russian Federation;
Hamdulaeva G.N., Junior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Danilova E.M., Pediatrician, Head of the Polyclinic Department of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Bespalova G.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.12.2019
 Отправлена на доработку 13.02.2020
 Принята к печати 11.03.2020

Received 08.12.2019
 Revision received 13.02.2020
 Accepted 11.03.2020

УРОВЕНЬ КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КОРИ У СОТРУДНИКОВ ОТДЕЛЬНОЙ БОЛЬНИЦЫ В РАМКАХ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ

М.П. Костинов^{1,2}, Н.Н. Филатов^{1,2}, П.И. Журавлев¹, Л.С. Гладкова^{3,4},
В.Б. Полищук¹, А.Д. Шмитко¹, Д.В. Пахомов¹, Е.А. Хромова¹, Г.В. Васильева¹,
И.А. Тихонова³, А.А. Рыжов¹, Д.А. Благовидов¹, А.М. Костинова⁵

¹ ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

⁵ ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. В апреле 2018 г. проведен анализ состояния уровня коллективного иммунитета к вирусу кори у 1899 сотрудников отдельной больницы г. Москвы в возрасте от 19 до 69 лет и старше в рамках государственной программы элиминации кори. В медицинской карте у всех работников имелась запись о наличии вакцинации или перенесенной кори. Из сывороток исследованных методом ИФА на наличие IgG-антител к вирусу кори с использованием тест-системы «Вектор-Бест IgG-корь» (Россия) 278 (14,6%) были серонегативными (< 0,18 МЕ/мл), 1621 (85,4%) — серопозитивными (≥ 0,18 МЕ/мл). При распределении 1855 сывороток по группам в зависимости от возраста установлено, что среди лиц 19–23 лет доля серонегативных равна 38,5%; 24–28 и 29–33 лет — 22,2%; 34–38 лет — 27,5%; 39–43 лет — 25,8%; 44–48 лет — 16,8%; 49–53 и 54–58 лет — 8,6 и 8,3%; 59–63 лет — 4,9%; 64–68 и старше 69 лет — 0%. Средний уровень IgG-антител к вирусу кори увеличивался пропорционально возрасту сотрудников от 0,58 МЕ/мл (19–23 года) до 2,94–2,72 МЕ/мл (64–68 и старше 69 лет). Полученные результаты указывают, что среди сотрудников молодого и среднего возраста (с 19 до 48 лет) выявляется когорта лиц, восприимчивых к кори — от 38,5 до 16,8%. Предполагается, что полученные в детстве 2 дозы вакцины не способствуют длительному сохранению защитных уровней антител, в связи с чем возникает необходимость введения 3 дозы препарата.

Ключевые слова: коллективный иммунитет, корь, антитела к вирусу кори.

Адрес для переписки:

Журавлев Павел Иванович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А,
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 962 939-76-98 (моб.).
E-mail: pvazhurik@gmail.com

Contacts:

Pavel I. Zhuravlev
105064, Russia, Moscow, Malyy Kazionniy lane, 5A,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 962 939-76-98 (mobile).
E-mail: pvazhurik@gmail.com

Библиографическое описание:

Костинов М.П., Филатов Н.Н., Журавлев П.И., Гладкова Л.С.,
Полищук В.Б., Шмитко А.Д., Пахомов Д.В., Хромова Е.А.,
Васильева Г.В., Тихонова И.А., Рыжов А.А., Благовидов Д.А.,
Костинова А.М. Уровень коллективного иммунитета к вирусу кори
у сотрудников отдельной больницы в рамках государственной
программы элиминации кори // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1.
С. 129–136. doi: 10.15789/2220-7619-LOM-690

Citation:

Kostinov M.P., Filatov N.N., Zhuravlev P.I., Gladkova L.S., Polischuk V.B.,
Shmitko A.D., Pakhomov D.V., Khromova E.A., Vasilyeva G.V., Tikhonova I.A.,
Ryzhov A.A., Blagovidov D.A., Kostinova A.M. Level of measles herd
immunity assessed in hospital medical workers within a framework
of the state measles elimination program // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 129–136.
doi: 10.15789/2220-7619-LOM-690

LEVEL OF MEASLES HERD IMMUNITY ASSESSED IN HOSPITAL MEDICAL WORKERS WITHIN A FRAMEWORK OF THE STATE MEASLES ELIMINATION PROGRAM

Kostinov M.P.^{a,b}, Filatov N.N.^{a,b}, Zhuravlev P.I.^a, Gladkova L.S.^{c,d}, Polischuk V.B.^a, Shmitko A.D.^a, Pakhomov D.V.^a, Khromova E.A.^a, Vasilyeva G.V.^a, Tikhonova I.A.^c, Ryzhov A.A.^a, Blagovidov D.A.^a, Kostinova A.M.^e

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

^b *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation*

^c *The City Clinical Hospital named after D.D. Pletnev of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation*

^d *Moscow State University of Food Industries, Moscow, Russian Federation*

^e *National Research Center Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation*

Abstract. Within a framework of the state measles elimination program, in April, 2018 a level of measles herd immunity was assessed in 1899 Moscow hospital medical workers aged from 19 to 69 years and older. All subjects enrolled in the study were vaccinated against measles or recovered after measles infection. Serum samples were collected from subjects and examined by ELISA for measles IgG antibodies with the Vector-Best IgG-measle test system (Russia). It was found that 278 (14.6%) and 1621 (85.4%) subjects were seronegative (< 0.18 IU/mL) and seropositive (≥ 0.18 IU/ml), respectively. Age-related group distribution of 1855 serum samples revealed that percentage of seronegative subjects was in: aged 19–23 years was 38.5%; 24–28 and 29–33 years — 22.2%; 34–38 years — 27.5%; 39–43 years — 25.8%; 44–48 years — 16.8%; 49–53 and 54–58 years — 8.6% and 8.3%, respectively; 59–63 years old — 4.9%; 64–68 and over 69 years old — 0%. Moreover, mean level of measles IgG antibodies increased proportionally to age of medical workers from 0.58 IU/ml (19–23 years) to 2.94–2.72 IU/ml (64–68 and over 69 years). The data obtained indicate that a cohort of measles susceptible subjects (from 38.5% to 16.8%), respectively, is identified among young and middle age (from 19 to 48 years) individuals. It is assumed that two-dose measles vaccination in childhood does not contribute to the long-term preservation of protective levels of measles antibodies, thereby justifying a need to administer a three-dose measles vaccine.

Key words: *collective immunity, measles, antibodies to measles virus.*

Введение

Ликвидация кори продолжает оставаться одной из приоритетных задач ВОЗ [34]. В Российской Федерации корь — инфекция с непредсказуемыми вспышками, несмотря на массовую вакцинацию населения вплоть до 35-летнего возраста и иммунизацию до 55 лет работников, относящихся к группам риска (работников медицинских, образовательных учреждений, организаций торговли, транспорта, коммунальной и социальной сферы) [19, 22]. Можно перечислить большое количество причин, но неоспорим тот факт, что коревая инфекция регистрируется среди различных возрастных групп как невакцинированных, так и привитых лиц. По данным федерального государственного статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» в 2017 г. в РФ зарегистрировано 725 случаев кори, показатель заболеваемости составил 0,5 на 100 тыс. населения. Заболевания кори зарегистрированы в 31 субъекте РФ. Наибольшее число заболевших зарегистрировано в г. Москве — 333 случая (2,72 на 100 тыс. населения), Московской области — 153 случая (2,1 на 100 тыс. населения). Зафиксированы групповые очаги, в том числе в организованных коллективах и медицинских организациях [20, 21].

Необычными кажутся случаи заболевания корью среди медицинских работников, кото-

рые должны быть защищены от инфицирования, поскольку данная профессия обязывает не только лечить болезнь, но и проводить профилактические мероприятия по борьбе с любой инфекционной патологией. Согласно распорядительным документам с 2014 г. при работе в медицинских учреждениях все сотрудники имеют документально подтвержденные сведения о проведенных профилактических прививках, в том числе против вируса кори. Тем не менее, в Москве регистрируются внутрибольничные вспышки кори среди пациентов и медицинских работников. Так, по данным Роспотребнадзора в городе Москве, в 2017 г. в Москве было зарегистрировано 8 внутрибольничных вспышек, а за 4 месяца 2018 г. — 9. Однако остается неопределенным, восприимчивы ли к данной вакциноуправляемой инфекции работники медицинских организаций или нет, что и явилось предметом настоящего исследования. Цель исследования — изучение иммунитета к вирусу кори у сотрудников городской клинической больницы.

Материалы и методы

Исследовано 1899 сывороток крови персонала одной из клинических больниц г. Москвы. Сроки взятия крови и определения уровней IgG-антител к вирусу кори — апрель 2018 г. — установлены согласно распоряжению Департамента здравоохранения г. Москвы. Возраст сотрудников составлял от 19 до 68 лет.

Отдельную группу составляли лица старше 69 лет (59 человек). На момент обследования участники не имели острых респираторных заболеваний и обострения сопутствующей соматической патологии. Прививочному анамнезу, а также сведениям о перенесенной коревой инфекции отдельного значения не придавалось, поскольку для нас была важна оценка коллективного иммунитета, без учета информации в амбулаторной карте у лиц до 55 лет; в медицинской карте данная строка была помечена одним из указанных ответов: «привит» или «болел». Организация работы по забору и транспортировке материала осуществлялась госпитальными эпидемиологами больницы, исследование сывороток — сотрудниками лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Сыворотки крови (без замораживания) исследовали в ИФА на наличие IgG-антител к вирусу кори с использованием тест-системы «Вектор-Бест IgG-корь» (Россия) согласно прилагаемой нормативно-технической документации. В соответствии с инструкцией по расчету количественного определения IgG-антител к вирусу кори результат анализа считался отрицательным, если концентрация антител в исследуемом образце была менее 0,12 МЕ/мл; положительным — если более или равна 0,18 МЕ/мл. Также к отрицательным (серонегативным) были отнесены сыворотки с неопределенной концентрацией IgG-антител к вирусу кори (в диапазоне 0,12–0,18 МЕ/мл), поскольку данный уровень антител не может считаться достоверно защитным.

При анализе полученных результатов для каждой возрастной группы проведены расчеты средних геометрических уровней антител, стандартного отклонения и доверительных интервалов, а также определен процент лиц с защитными уровнями антител к вирусу кори по отдельным группам.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Excel 2010.

Результаты

Из исследованных 1899 сывороток 278 (14,6%) были серонегативными, 1621 (85,4%) — серопозитивными ($\geq 0,18$ МЕ/мл) к вирусу кори. При анализе сывороток в зависимости от возраста в исследование включено 1855 образцов, так как данных о 44 сотрудниках больницы не было указано (табл.).

Показано, что по мере увеличения возраста работников медицинского учреждения доля серонегативных снижалась с 38,5% для лиц 18–23 лет до 0% для сотрудников в возрасте 64 и более лет. При этом обращает на себя внимание тот факт, что самые молодые сотрудники (19–23 лет), получившие ревакцинацию в возрасте 6–7 лет, спустя 13–17 лет составили группу с наибольшей долей (38,5%) серонегативных к вирусу кори лиц. Группа работников в возрасте 24–48 лет также характеризовалась наличием большого количества серонегативных лиц — от 16,8 до 27,5%. Относительно сотрудников медицинского учреждения в возрасте 49–58 лет исследование показало, что число серонегативных среди них было меньше в среднем в 2 раза по сравнению с сотрудниками в возрасте 24–48 лет и составляло 8,3–8,6%. Среди лиц 59–63 лет встречались единичные лица без защитных уровней антител (4,9%), а в группе старше 64 лет серонегативных лиц не встречалось.

Следует отметить, что средний геометрический уровень IgG-антител к вирусу кори увеличивался пропорционально возрасту сотрудников от 0,58 МЕ/мл (19–23 года) до 2,94 — 2,72 МЕ/мл (64–68 лет) и старше 69 лет (рис.). То есть чем меньше в группе регистрировалась доля серонегативных лиц, тем выше был уровень IgG-антител к вирусу кори.

Обсуждение

Эпидемическая ситуация по кори считается благополучной, если процент серонегативных лиц в популяции составляет менее 7%. Исходя из полученных результатов, среди работников отдельного медицинского учреждения выявлена когорта серонегативных к вирусу кори лиц (14,6%) в 2 раза выше предусмотренной нормативом, что может служить источником вспышки коревой инфекции при неблагоприятной эпидемической ситуации.

Причина регистрации большего количества серонегативных лиц (38,5–16,8%) среди молодых сотрудников больницы (18–48 лет) вероятно связана с формированием непрочного иммунитета после введения одной или двух доз вакцин для лиц рожденных после 1980 г., так как введение бустерной (второй) дозы вакцины в рамках Национального календаря профилактических прививок регламентировано с 1987 г. Также следует принимать во внимание, что вакцинация детей в возрасте 12 месяцев и ревакцинация в 6–7 лет (согласно Национальному календарю профилактических прививок РФ) при наличии какой-либо сопутствующей патологии не приводит к 100%

Таблица. Доля серонегативных и серопозитивных к вирусу кори лиц у сотрудников медицинского учреждения в зависимости от возраста

Table. Proportion of individuals with protective anti-measles antibody levels and seronegative individuals to measles virus of medical staff depending on age

Показатели Indicators	Число обследованных The number of examined										
	19–23	24–28	29–33	34–38	39–43	44–48	49–53	54–58	59–63	64–68	69 <
Возраст, лет Age, years	19–23	24–28	29–33	34–38	39–43	44–48	49–53	54–58	59–63	64–68	69 <
N	39	90	117	200	213	285	244	277	203	128	59
Лица с защитными титрами антител Individuals with protective anti-measles antibody levels	24	70	91	145	158	237	223	254	193	128	59
Доля лиц с защитными титрами антител, % Proportion of individuals with protective anti-measles antibody levels, %	61,5	77,8	77,8	72,5	74,2	83,2	91,4	91,7	94,1	100	100
Доверительные интервалы 95% Confidence intervals 95%	45,87–75,14	68,08–85,2	69,38–84,41	65,92–78,23	67,89–79,61	78,36–87,08	87,15–94,36	87,8–94,45	91,06–97,41	96,5–100,59	92,69–101,2
Доля серонегативных лиц, % Proportion of seronegative individuals, %	38,5	22,2	22,2	27,5	25,8	16,8	8,6	8,3	5,9	0	0
Доверительные интервалы 95% Confidence intervals 95%	24,86–56,13	14,8–31,92	13,41–27,84	21,77–34,08	20,39–32,11	12,92–21,64	5,64–12,85	5,55–12,20	2,59–8,94	0,0–3,5	0,0–7,31

формированию защитных уровней специфических антител к вирусу кори. Доказано, что у детей с частыми респираторными инфекциями, возникающими преимущественно при патологии ЛОР-органов, аллергическими заболеваниями доля серонегативных лиц через 1 год после завершения ревакцинации достигает 30,4–33,3% случаев [6, 7, 9, 10, 14, 23, 25, 27].

Заболеванию корью детей первого года жизни, до вакцинации, может способствовать наличие акушерской патологии у матери во время беременности и нарушение трансплацентарной передачи антител. В работах отечественных авторов доказано, что доля серонегативных среди новорожденных детей, рожденных от серопозитивных матерей с плацентарной недостаточностью, гестозами и др., может достигать 30% [2, 16, 32, 33].

Следует отметить, что полученные нами результаты распределения долей серонегативных лиц в возрастных группах 19–23 (38,5%) и 39–43 лет (25,8%) являются аналогичными исследованию сывороток крови пациентов 18–40 лет в Гвинейской Республике, в котором доля серонегативных лиц составила $28,5 \pm 5,1$ от числа обследованных [24].

Регистрируемые нами результаты по наличию прямой зависимости между уровнем защитных специфических IgG-антител к вирусу кори и возрастом персонала городской клинической больницы согласуются с ранее полученными при исследовании пуповинной крови новорожденных (672 сыворотки). Как было показано, с увеличением возраста матерей количество серонегативных лиц снижалось (11,8%), а уровень защитных специфических антител возрастал, составляя для лиц 36–43 лет (0,98 МЕ/мл) [16, 29, 33]. Следует отметить, что у медицинских сотрудников аналогичного возраста средний уровень IgG-антител к вирусу кори составлял 1,01 МЕ/мл, что не отличалось от лиц в общей популяции.

У лиц старше 50 лет снижение доли серонегативных и значительное увеличение уровня IgG-антител к вирусу кори, вероятно, может быть объяснено перенесенной в той или иной форме коревой инфекцией, так как вакцинация против кори проводится с 1968 г. Хотя нельзя исключить роль вакцинации данной группы уже после перенесенной ранее инфекции. Также обращает на себя внимание, что у молодых сотрудников больницы в возраст-

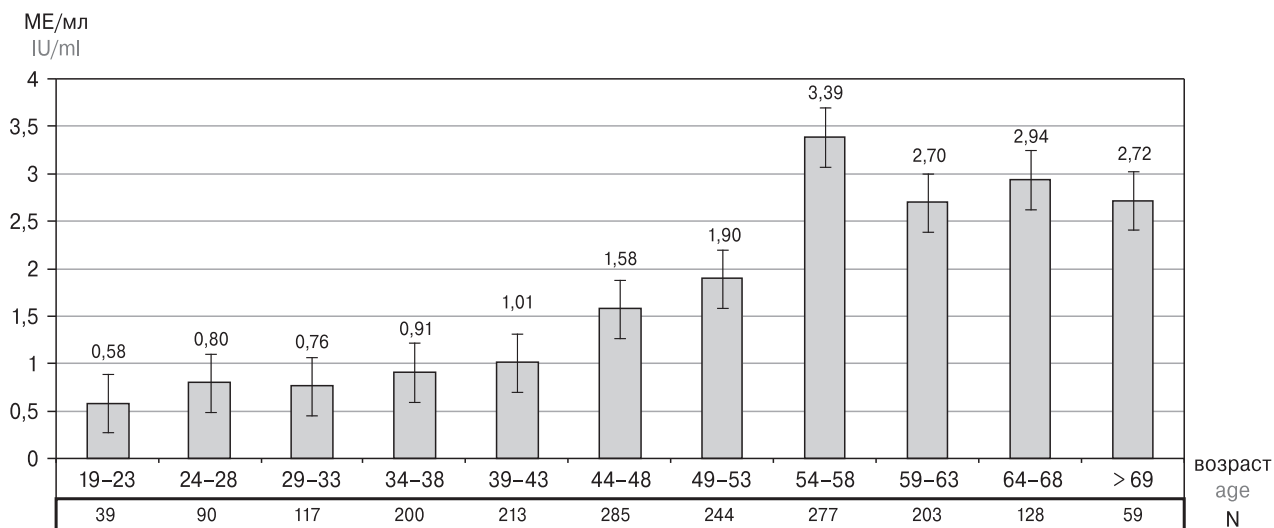


Рисунок. Уровень IgG-АТ к вирусу кори у сотрудников медицинского учреждения в зависимости от возраста

Figure. Anti-measles IgG antibody levels among examined medical staff depending on age

те от 19 до 43 лет регистрируются невысокие уровни IgG-антител к вирусу кори — от 0,58 до 1,01 МЕ/мл. Вероятно, с возрастом концентрация антител будет снижаться, что приведет к необходимости дополнительного введения вакцины против кори. В связи с этим принятая в настоящее время государством стратегия вакцинации от кори лиц до 55 лет оправдана. При возникновении необходимости предвакцинальное серомониторирование тоже имеет право на существование.

На практике часто возникает вопрос, является ли вакцинация опасной для пациента ранее перенесшего атипичную форму коревой инфекции или получавшего в рамках Национального календаря прививок 2 дозы вакцины? Наш опыт показывает, что это безопасно, а для пациентов с нарушенным состоянием здоровья введение третьей дозы вакцины является необходимым [3, 5, 8, 11, 28]. Вероятно, в будущем при накоплении большего количества материала как по эпидемической ситуации по кори, так и по длительности сохранения поствакцинального иммунитета среди различных возрастных групп населения, введение третьей дозы вакцины против кори станет обязательным и будет осуществляться в массовом порядке у школьников в возрасте 14–15 лет (одновременно с ревакцинацией против дифтерии, столбняка и полиомиелита) [17, 18].

Другим подходом к решению проблемы распространения кори, особенно в настоящее время, может явиться сочетанная вакцинация против кори с применением одного из препаратов с иммунокорригирующим действием,

который способствует синтезу специфических антител в более высоких значениях и на более длительный срок [1, 7, 12, 13, 30, 31].

Заключение

На современном этапе при неблагоприятной эпидемической ситуации в г. Москве, мониторинг уровня антител к вирусу кори среди работников медицинских организаций является приоритетным, дающим «истинное» представление о напряженности иммунитета к кори. В случае отсутствия возможности исследования сотрудников, в первую очередь следует вакцинировать против кори молодых работников учреждения, особенно лиц 19–23 лет; во вторую очередь — лиц в возрасте 24–48 лет. Сотрудники в возрасте 49–63 лет представляют наименьшую опасность по инфицированию корью, но с учетом вероятности наличия единичных серонегативных лиц в данной возрастной группе могут быть вакцинированы в последнюю очередь. Сотрудники старшего возраста — 64 и более лет, не представляют опасности по инфицированию корью, однако не может быть исключена вероятность транзитного переноса ими вируса на слизистой носоглотки в случае контакта с больным.

Выбор вакцинного препарата, а именно моновалентного или ассоциированного с эпидемическим паротитом, краснухой, определяется индивидуально, так же как и возможность одномоментной вакцинации против кори и других инфекционных заболеваний. Все вакцинные препараты безопасны и иммуногенны вне зависимости от производителя [12, 25].

Список литературы/References

1. Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорригирующих препаратов // Лечащий врач. 2010. № 4. С. 9. [Afinogenova V.P., Lukachev I.V., Kostinov M.P. Immunotherapy: mechanism of action and clinical use of immunocorrecting drugs. *Lechashchiy vrach = The Attending Physician*, 2010, no. 4, p. 9. (In Russ.)]
2. Бочарова И.И., Костинов М.П., Новикова С.В., Шмитько А.Д., Обидина А.А., Цивцивадзе Е.Б. Трансплацентарные антитела к вирусу кори у новорожденных при различном течении беременности у их матерей // Российский вестник акушера-гинеколога. 2014. Т.2, № 14. С. 14–18. [Bocharova I.I., Kostinov M.P., Novikova S.V., Shmit'ko A.D., Obidina A.A., Cıvcıvadze E.B. Transplacental antibodies to measles virus in newborns with their mothers' different pregnancy. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = The Russian Bulletin of the Obstetrician-Gynecologist*, 2014, vol. 2, no. 14, pp. 14–18. (In Russ.)]
3. Зверев В.В., Хаитов Р.М. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Zverev V.V., Haitov R.M. Vaccines and vaccination. National leadership. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2014. 640 p. (In Russ.)]
4. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Практическое руководство для врачей. 1-е изд. М.: Медицина для всех, 1996. 78 с. [Kostinov M.P. Vaccination of children with impaired health. Practical guide for doctors. 1st ed. *Moscow: Medicina dl'ya vseh*, 1996. 78 p. (In Russ.)]
5. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Практическое руководство для врачей. 2-е изд. М.: Медицина для всех, 2000. 120 с. [Kostinov M.P. Vaccination of children with impaired health. Practical guide for doctors. 2nd ed. *Moscow: Medicina dl'ya vseh*, 2000. 120 p. (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 impaired health. Practical guide for doctors. 4th ed. *Moscow: Medicina dl'ya vseh*, 2013. 432 p. (In Russ.)]
7. Костинов М.П. Иммунокоррекция в педиатрии. Практическое руководство для врачей. М.: Медицина для всех, 1997. 111 с. [Kostinov M.P. Immunotherapy in Pediatrics. A practical guide for physicians. *Moscow: Medicina dl'ya vseh*, 1997. 111 p. (In Russ.)]
8. Костинов М.П. Новое в клинике, диагностике и вакцинопрофилактике управляемых инфекций. М.: Медицина для всех, 1997. 110 с. [Kostinov M.P. The news in clinic, diagnostics and vaccinal prevention of controlled infections. *Moscow: Medicina dl'ya vseh*, 1997. 111 p. (In Russ.)]
9. Костинов М.П., Магаршак О.О. Проблемы вакцинации детей с аллергическими заболеваниями // Лечащий врач, 2008. № 9. С. 44–48 [Kostinov M.P., Magarshak O.O. Problems of vaccination of children with allergic diseases. *Lechashchiy vrach = The Attending Physician*, 2008, no. 9, pp. 44–48. (In Russ.)]
10. Костинов М.П., Гервазиева В.Б., Балаболкин И.И. Иммунологическая реактивность детей с аллергическими заболеваниями при коревом вакцинальном процессе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1990. № 3. С. 81–84. [Kostinov M.P., Gervazieva V.B., Balabolkin I.I. Immunological reactivity of children with allergic diseases in the measles vaccine process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*, 1990, no. 3, pp. 81–84. (In Russ.)]
11. Костинов М.П., Зверев В.В. Вакцинация против гепатита В, гриппа и краснухи взрослых пациентов с хроническими заболеваниями. Москва: МДВ, 2009. 196 с. [Kostinov M.P., Zverev V.V. Vaccination against hepatitis B, influenza and rubella adult patients with chronic diseases. *Moscow: MDV*, 2009. 196 p. (In Russ.)]
12. Костинов М.П., Лавров В.Ф. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний. 2-е изд. допол. Москва: МДВ, 2010. 192 с. [Kostinov M.P., Lavrov V.F. Vaccines of a new generation in the prevention of infectious diseases. 2nd ed. *Moscow: MDV*, 2010, 192 p. (In Russ.)]
13. Костинов М.П., Кулакова Н.А. Иммуномодуляции при вакцинации больных ХОБЛ. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018. 100 с. [Kostinov M.P., Kulakova N.A. Immunomodulation in vaccination of COPD patients. *LAP LAMBERT Academic Publishing*, 2018. 100 c. (In Russ.)]
14. Костинов М.П., Озерецковский Н.А. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов. Справочник. М.: Миклош, 2004. 256 с. [Kostinov M.P., Ozeretskovsky N.Ah. Clinical and immunological efficacy of immunobiological drugs. Handbook. *Moscow: Miklosh*, 2004. 256 p. (In Russ.)]
15. Костинов М.П., Соловьева И.Л. Иммуномодуляторы и вакцинация. М.: 4Мпресс, 2013. 272 с. [Kostinov M.P., Soloviev I.L. Immunomodulators and vaccination. *Moscow: 4mpress*, 2013. 272 p. (In Russ.)]
16. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Бочарова И.И., Черданцев А.П., Сависько А.А., Полищук В.Б. Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных с учетом возраста матерей // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. № 3 С. 30–34. [Kostinov M.P., Shmit'ko A.D., Bocharova I.I., Cherdantsev A.P., Savisko A.A., Polishchuk V.B. Measles virus-specific IgG-antibodies level in umbilical cord blood according to the maternal age. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2014, no. 3, pp. 30–34. (In Russ.)]
17. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., Черданцев А.П. Необходима ли третья доза вакцины против кори — взгляд иммунолога // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 88–94. [Kostinov M.P., Shmit'ko A.D., Soloviev I.L., Savisko A.A., Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Cherdantsev A.P. Is a third dose of the measles vaccine necessary — an immunologist's view. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 88–94. (In Russ.)]
18. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Черданцев А.П. Защищены ли от кори дети с аллергическими заболеваниями и часто болеющие после ревакцинации // Педиатрия. 2017. Т. 4, № 96. С. 140–145. [Kostinov M.P., Shmit'ko A.D., Soloviev I.L., Savisko A.A., Cherdantsev A.P. Are the children with allergic diseases and sickly children resistant to measles after revaccination. *Pediatriya = Russian Pediatrics*, 2017, vol. 4, no. 96, pp. 140–145. (In Russ.)]

19. О внесении изменений в приложения № 1 и 2 к приказу Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2014 г. № 125Н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»: Приказ Минздрава РФ от 16.06.2016 № 370Н. [About modification of appendices No. 1 and 2 to the order of the Ministry of Health of the Russian Federation of March 21, 2014, No. 125N "About the approval of the national calendar of preventive inoculations and the calendar of preventive inoculations on epidemic indications": the Order of the Ministry of health of the Russian Federation 16.06.2016 No. 370N].
20. О заболеваемости корью и дополнительных мерах профилактики. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: Письмо от 8 февраля 2018 г. № 01/1730-2018-32. [About measles incidence and additional prevention measures. The Federal service for supervision of consumer rights protection and human well-being: the Letter of February 8, 2018 N 01/1730-2018-32].
21. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ в 2016 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: Государственный доклад. Москва, 2017. 220 с. [About the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2016, the Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare: State report. Moscow, 2017. 220 p.]
22. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям: Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 года № 125н. [About the approval of the national calendar of preventive vaccinations and the calendar of preventive vaccinations on epidemic indications: the Order of the Ministry of health of the Russian Federation of March 21, 2014, No. 125n].
23. Полищук В.Б., Рыжов А.А., Костинов М.П., Магаршак О.О., Шмит'ко А.Д., Лукачев И.В., Васильева Г.В., Благовидов Д.А., Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Карчевская Н.А. Состояние противокоревой иммунности у пациентов листа ожидания трансплантации легких // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2016. № 4. С. 55–60. [Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Kostinov M.P., Magarshak O., Shmit'ko A.D., Lukachev I.V., Vasiliev G.V., Blagovidov D.A., Chuchalin A.G., Avdeev S.N., Karchevskaya N. Condition of anti-measles immunity in patients on waiting-list for lung transplantation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = The Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*, 2016, no. 4, pp. 55–60. (In Russ.)]
24. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 2 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 79–84. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian Areg A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the Republic of Guinea within the framework of global measles elimination program. Report 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-79-84 (In Russ.)]
25. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск: УлГУ, 2006. 296 с. [Solovieva I.L., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Features of vaccination of children with changed premorbid background against hepatitis B, measles, mumps. *Ulyanovsk: UlSTU. 2006. 296 p. (In Russ.)]*
26. Соловьева И.Л., Кусельман А.И., Костинов М.П., Анохина Е.В. Применение иммуномодулирующих препаратов в подготовке детей к вакцинации // Аллергология и иммунология. 2007. Т. 2, № 8. С. 206–208. [Solovieva I.L., Keselman I.A., Kostinov M.P., Anokhina E.V. Application of immunomodulatory drugs in the preparation of children for vaccination. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2007, vol. 2, no. 8, pp. 206–208. (In Russ.)]
27. Соловьева И.Л., Лежень Е.М., Кусельман А.И., Костинов М.П., Муканова Д.С., Крашенинникова Е.Ю. Вакцинация часто болеющих детей отечественной паротитно-коревой вакциной // Ульяновский медико-биологический журнал. 2013. № 2. С. 20–25. [Solovieva I.L., Lezen E.M., Kuselman A.I., Kostinov M.P., Mukanova D.S., Krasheninnikova E.Y. Vaccination of ailing children with home-made measles and parotitis vaccine. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal = Ulyanovsk Medico-Biological Journal*, 2013, no. 2, pp. 20–25. (In Russ.)]
28. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 656 с. [Khaitov R.M., Ilina N.I. Allergy and immunology. National leadership]. *Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 656 p. (In Russ.)]*
29. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И. Вакцинация беременных против гриппа и других инфекционных заболеваний. Руководство для врачей. М.: Группа МДВ, 2018. 143 с. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Vaccination of pregnant women against influenza and other infectious diseases. A guide for physicians]. *Moscow: MDV Group, 2018. 143 p. (In Russ.)]*
30. Чучалин А.Г., Хохлова А.Л. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Вып. XVIII. М., 2017. 848 с. [Chuchalin A.G., Khokhlov A.L. Federal guidance on the application of drugs (formulary system). Iss. XVIII. *Moscow, 2017. 848 p. (In Russ.)]*
31. Чучалин А.Г., Яснецов В.В. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Вып. XVI. М., 2015. 1016 с. [Chuchalin A.G., Khokhlov A.L. Federal guidance on the application of drugs (formulary system). Iss. XVIII. *Moscow, 2015. 1016 p. (In Russ.)]*
32. Шмит'ко А.Д., Костинов М.П., Бочарова И.И., Сависько А.А., Магаршак О.О., Полищук В.Б. Трансплацентарные IgG к вирусу кори в пуповинной крови у новорожденных разных регионов Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2015. № 1. С. 52–57. [Shmit'ko A.D., Kostinov M.P., Bocharova I.I., Savisko A.A., Magarshak O.O., Polishchuk V.B. Transplacental IgG against measles virus in umbilical blood of neonates from various regions of the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = The Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*, 2015, no. 1, pp. 52–57. (In Russ.)]

33. Шмитько А.Д., Новикова С.В., Бочарова И.И., Якубина А.А., Костинов М.П. Механизмы и факторы, влияющие на трансплацентарную передачу антител класса IgG в системе мать-плацента-плод // Российский вестник акушера-гинеколога. 2014. № 6. С. 27–31. [Shmit'ko A.D., Novikova S.V., Bocharova I.I., Yakubina, A.A., Kostinov M.P. The mechanisms and factors influencing the transplacental transmission of IgG antibodies in the mother-placenta-fetus system. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa* = *Russian Bulletin of the Obstetrician-Gynecologist*, 2014, no. 6, pp. 27–31. (In Russ.)]
34. Kutte P., Rota J., Bellini W., Redd S.B., Barskey A., Wallace G. CDC. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. 2011.

Авторы:

Костинов М.П., д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Филатов Н.Н., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зам. директора ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой эпидемиологии ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Журавлев П.И., аспирант лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Гладкова Л.С., к.м.н., зам. главного врача больницы по санитарно-эпидемиологическим вопросам ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия; доцент кафедры эпидемиологии и социальной гигиены Института медико-социальных технологий ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств, 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;

Шмитько А.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Пахомов Д.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Хромова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Васильева Г.В., младший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Тихонова И.А., врач-эпидемиолог ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Рыжов А.А., младший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Благовидов Д.А., младший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Костинова А.М., ординатор ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия.

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, 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;

Filatov N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Deputy Director, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Epidemiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Zhuravlev P.I., PhD Student, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Gladkova L.S., PhD (Medicine), Deputy Chief Doctor for Sanitary and Epidemiological Issues, City Clinical Hospital named after D.D. Pletnev of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Epidemiology and Social Hygiene, Institute of Medical and Social Technologies, Moscow State University of Food Industries, Moscow, Russian Federation;

Polischuk V.B., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Shmitko A.D., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Pakhomov D.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Khromova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Vasilyeva G.V., Junior Researcher, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Tikhonova I.A., Epidemiologist, City Clinical Hospital named after D.D. Pletnev of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation;

Ryzhov A.A., Junior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Blagovidov D.A., Junior Researcher, Department of Vaccination and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Kostinova A.M., Resident Physician, National Research Center Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.05.2018
Отправлена на доработку 26.03.2019
Принята к печати 04.06.2019

Received 24.05.2018
Revision received 26.03.2019
Accepted 04.06.2019

ФОРМИРОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА НА КОРЕВУЮ ВАКЦИНУ У ВЗРОСЛЫХ

А.П. Топтыгина^{1,3}, Ю.Ю. Андреев¹, М.А. Смердова¹, А.Ю. Зеткин², Т.Г. Клыкова²

¹ ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГКУ Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. Несмотря на приверженность большинства стран политике массовой вакцинации населения против кори, все еще не удается достичь элиминации этой инфекции. По всему миру отмечаются вспышки кори, где подавляющее большинство заболевших относится к возрасту 18–35 лет. Исследования противокоревых IgG-антител в разных регионах России выявляют повышение уровня серонегативных к вирусу кори среди молодых взрослых. Целью настоящего исследования было изучить процессы формирования гуморального и клеточного иммунитета в ответ на прививку против кори у серонегативных взрослых в возрасте от 18 до 30 лет. В исследовании участвовали 50 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 30 лет, серонегативных в отношении антител к кори. Уровень противокоревых IgM и IgG определяли методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Субклассы специфических IgG-антител определяли методом ИФА, заменив IgG-конъюгат на IgG1-, IgG2-, IgG3-, IgG4-конъюгаты, специфические IgA-антитела определяли методом ИФА с использованием IgA-конъюгата (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Авидность антител определяли методом ИФА (Euroimmun, Германия). Клеточный противокоревой иммунитет оценивали по уровню экспрессии CD107a на CD8^{hi}-лимфоцитах в ответ на антигены вирусов кори. Специфический клеточный ответ на антигены вирусов кори до вакцинации был выявлен у 50% обследованных лиц, у 40% противокоревого клеточного иммунного ответа не было, а у 10% ответ был расценен как сомнительный. Через 6 недель после вакцинации все привитые выработали специфические IgG-антитела против вируса кори в защитном количестве 1,33 (0,85–1,82) МЕ/мл [Ме (LQ–UQ)]. Противокоревые IgA-антитела составили 0,655 (0,423–1,208) МЕ/мл [Ме (LQ–UQ)]. Специфических IgM-антител через 6 недель после вакцинации не обнаружено. Первичным типом иммунного ответа (преобладание низкоавидных специфических антител IgG3-субкласса) реагировали на прививку 24 из 50 человек, а вторичный тип иммунного ответа (высокоавидные противокоревые антитела преимущественно IgG1-субкласса) продемонстрировали 26 человек. Специфический клеточный иммунный ответ на антигены вируса кори был обнаружен у 47 из 50 обследованных, у 3 человек ответ был расценен как сомнительный. Дальнейший анализ позволил выделить группу людей, не вакцинированных против кори (18 человек), хотя у 60% из них имелись сведения о двукратной прививке в детстве, и группу вакцинированных в детстве от кори (32 человека), утративших в процессе жизни защитные антитела (23 человека), антитела (плазматические клетки) и Т-клетки памяти (3 человека), антитела и В-клетки памяти (6 человек). Такое распределение свидетельствует о том, что клеточный и гуморальный иммунный ответы против вирусов кори формируются и сохраняются независимо друг от друга.

Ключевые слова: корь, антитела, специфический клеточный иммунитет, вакцинация взрослых.

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: 8 (495) 452-18-01 (служебн.). Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Contacts:

Anna P. Toptygina
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (495) 452-18-01 (office). Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Библиографическое описание:

Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г. Формирование гуморального и клеточного иммунитета на коревую вакцину у взрослых // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 137–144. doi: 10.15789/2220-7619-FOH-1334

© Топтыгина А.П. и соавт., 2020

Citation:

Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Zetkin A.Yu., Klykova T.G. Formation of humoral and cellular immunity to measles vaccine in adults // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 137–144. doi: 10.15789/2220-7619-FOH-1334

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-FOH-1334>

FORMATION OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY TO MEASLES VACCINE IN ADULTS

Топтыгина А.П.^{а,с}, Andreev Yu.Yu.^а, Smerdova M.A.^а, Zetkin A.Yu.^б, Klykova T.G.^б

^а G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^б Main Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision (of special purpose) of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^с Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Despite adherence to the policy of mass measles vaccination in the majority of countries, this infection still remains far from being fully eradicated. Measles outbreaks are reported worldwide, when the vast majority of cases are recorded in subjects of 18–35 years of age. Studies on assessing measles IgG antibody level in different regions of Russia reveal increased percentage of measles seronegative subjects among young adults. Current study was aimed at investigating formation of humoral and cellular immunity after measles vaccination in seronegative adults aged 18 to 30 years old. There were enrolled 50 measles seronegative healthy volunteers aged 18 to 30 years old. Level of anti-measles IgM and IgG antibodies was measured by ELISA (Vector-Best, Russia). Subclasses of measles specific IgG antibodies were analyzed by ELISA, by replacing IgG conjugate for IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 conjugates, whereas measles specific IgA antibodies were estimated by ELISA with IgA conjugate (Polygnost, Russia) at a concentration of 1 µg/ml. Antibody avidity was assessed by ELISA (Euroimmun, Germany). Cell-mediated measles immunity was estimated by CD107a surface expression on CD8hi T cell subset stimulated by measles virus-derived antigens. A specific cellular response to measles antigens before vaccination was detected in 50% of examined subjects, whereas 40% samples showed no signs of cellular immune response, with 10% of remaining cases described as equivocal. It was found that 6 weeks after vaccination all vaccinated subjects developed measles specific IgG antibodies at protective level reaching 1.33 (0.85–1.82) IU/ml [Me (LQ–UQ)]. Anti-measles IgA antibodies were of 0.655 (0.423–1.208) IU/ml [Me (LQ–UQ)]. However, no measles specific IgM antibodies were detected 6 weeks after vaccination. In addition, primary type of immune response (dominant low-avidity anti-measles antibodies IgG3 subclass) to measles vaccination was observed in 24 out of 50 subjects, whereas 26 subjects developed secondary type of immune response (high-avidity anti-measles antibodies dominated by IgG1 subclass). A measles specific cellular immune response was observed in 47 of the 50 examined subjects, and in 3 volunteers it was equivocal. Further analysis revealed a cohort of subjects who were not vaccinated against measles (18 subjects), although 60% of them provided medical record on previous dual measles vaccination occurred in childhood. Another cohort consisted of subjects who had medical record of measles vaccination in childhood (32 subjects), but lost protective measles antibodies produced by plasma cells (23 subjects), and memory T cells (3 subjects), or measles antibodies and memory B cells (6 subjects) over time. Such pattern evidences that measles-specific cellular and humoral arms immune responses were developed and maintained independently of each other.

Key words: measles, antibodies, specific cellular immunity, vaccination of adults.

Введение

Политика массовой вакцинации населения против кори, провозглашенная ВОЗ с целью элиминации этой опасной инфекции, привела к снижению заболеваемости и смертности от кори [23]. Тем не менее достичь элиминации этой инфекции пока не удастся, и на первый план стали выступать проблемы заболеваемости вакцинированных в детстве взрослых. [16, 19]. По всему миру отмечают вспышки кори, где подавляющее большинство заболевших относится к возрасту 18–35 лет [15, 18, 21]. Проводимые исследования уровня противокоревых IgG-антител в разных регионах нашей страны выявляют повышение уровня серонегативных к вирусу кори среди молодых здоровых взрослых [1, 2, 4, 14]. При этом 40–80% этих людей были привиты в детстве от кори, согласно прививочным документам, вторая часть обследованных либо не прививалась, либо не имела прививочных документов. Неясно, эти серонегативные действительно были привиты в детстве и утратили со временем защитный уровень

антител, или вакцинация была проведена некачественно, а, возможно, и вовсе не проводилась. Известно, что после вакцинации образуется не только гуморальный, но и специфический клеточный иммунитет, десятилетиями сохраняющийся в иммунном организме [12]. Кроме того, по спектру субклассов специфических IgG, формирующихся после прививки, можно понять, был ли данный человек ранее привит (реагирует на вакцинацию по вторичному типу иммунного ответа) или нет (первичный тип иммунного ответа) [10].

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования было изучить процессы формирования гуморального и клеточного иммунитета в ответ на прививку против вирусов кори у серонегативных взрослых в возрасте от 18 до 30 лет.

Материалы и методы

По результатам предварительного исследования сывороток крови от здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 30 лет было выявлено 50 чело-

век, не имевших антител к вирусу кори. Эти 50 человек составили группу обследуемых. В этой группе было проведено исследование специфического клеточного иммунитета к антигенам вируса кори. Затем все 50 человек были вакцинированы против кори вакциной коревой культуральной живой (Микроген, Россия, серия М231), согласно инструкции 0,5 мл подкожно однократно. Через 6 недель после вакцинации было проведено повторное исследование уровня специфических антител и специфического клеточного иммунитета против вирусов кори. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследованиях. Взятие крови осуществляли из локтевой вены в количестве 4 мл в пробирки с гелем и с гепарином натрия. Сыворотку крови, полученную центрифугированием, разливали в пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили до использования при -70°C . Специфические IgM- и IgG-антитела в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия) «ВектоКорь-IgM» и «ВектоКорь-IgG». Оценку специфической активности сывороток проводили согласно инструкции, прилагаемой к наборам. Защитным уровнем IgG для кори считали показатель 0,2 МЕ/мл [22]. Субклассы специфических IgG-антител определяли также методом ИФА в модификации [11]. Коротко: мы использовали 96-луночные панели, покрытые антигенами кори от коммерческого набора «ВектоКорь IgG», в качестве конъюгата использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также анти-IgA моноклональные антитела (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Авидность антител определяли методом ИФА с помощью коммерческого набора (Euroimmun, Германия).

Оценку специфического клеточного иммунитета к антигенам вируса кори осуществляли по ранее описанному методу [6, 12]. Коротко: фракцию мононуклеаров выделяли методом градиентного центрифугирования. Полученные лимфоциты культивировали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой с добавлением или без (контроль) антигенов вирусов кори при 37°C в атмосфере 5% CO_2 и 100% влажности. Клетки окрашивали FITC-мечеными антителами к CD8 и CD107a-PE-Cy5. Анализ на проточном цитометре FACSCantoII (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США) позволил выявить процент дважды положительных клеток, которые соответствовали дегранулировавшим цитотоксическим Т-лимфоцитам, распознавшим антиген вируса кори. Уровень спонтанной дегрануляции не превышал 1%.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с вычислением медианы, первой и третьей квартили [Me (LQ–UQ)] — для анализа концентрации антител и средней и ее ошибки ($M \pm SE$) — для анализа специфического клеточного иммунитета (программный пакет Microsoft Excel 10). Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

Специфический клеточный ответ на антигены вирусов кори до вакцинации против кори был выявлен у 50% обследованных лиц, у 40% специфического клеточного иммунного ответа на антигены кори обнаружено не было, а у 10% ответ был расценен как сомнительный. Иными словами, 20 из 50 человек не имели ни гуморального, ни клеточного иммунитета против вируса кори, а, следовательно, могли заболеть при контакте с больным корью.

Через 6 недель после вакцинации было выявлено, что все привитые выработали специфические антитела против вируса кори в защитном количестве. Средний уровень антител против вируса кори составил для IgG-антител 1,33 (0,85–1,82) МЕ/мл [Me (LQ–UQ)]. Также были выявлены специфические противокоревые IgA-антитела: 0,655 (0,423–1,208) МЕ/мл [Me (LQ–UQ)]. Через 6 недель после вакцинации не было обнаружено специфических IgM-антител.

Ранее было показано, что первичный и вторичный иммунный ответ различается по соотношению субклассов специфических IgG-антител. Так для первичного иммунного ответа характерно преобладание IgG3-субкласса, а для вторичного — IgG1-субкласса [8, 9, 10]. Для того чтобы понять, были ли те 20 человек, которые не имели ни антител, ни клеточного иммунитета к вирусу кори привиты, но утратили иммунитет в процессе жизни, или они не были реально вакцинированы в детстве, было важно узнать, первичным или вторичным иммунным ответом реагируют они на вакцинацию против кори. Было проведено разделение по спектру субклассов специфических IgG [10] на подгруппу А, ответившую на вакцинацию первичным типом иммунного ответа, и подгруппу Б, ответившую на прививку вторичным иммунным ответом. Оказалось, что первичным типом иммунного ответа реагировали на прививку 24 из 50 человек, а вторичный тип иммунного ответа продемонстрировали 26 человек, абсолютные значения полученных результатов представлены в таблице.

По уровню специфических IgG эти две подгруппы не различались, различия касались соотношения специфических IgG1- и IgG3-субклассов и авидности антител. На рисунке 1 хорошо видны различия в профилях субклас-

Таблица. Показатели специфического гуморального иммунного ответа через 6 недель после вакцинации против вируса кори, Me (LQ-HQ)

Table. Parameters of the specific humoral immune response in the 6 weeks after vaccination against measles virus, Me (LQ-HQ)

	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	Авидность Avidity
Первичный иммунный ответ (подгруппа А) Primary immune response (subgroup A)	1,24 (0,69–1,95)	0,80 (0,56–0,98)	0 (0–0)	0,96 (0,67–1,02)	0 (0–0,12)	0,73 (0,51–1,29)	39,8 (34,2–43,1)
Вторичный иммунный ответ (подгруппа Б) Secondary immune response (subgroup B)	1,35 (0,87–1,75)	1,18 (0,83–1,57)	0 (0–0)	0,22 (0,17–0,36)	0,12 (0–0,15)	0,61 (0,40–0,91)	82,8 (81,5–84,5)

сов IgG ответивших первичным (подгруппа А) и вторичным (подгруппа Б) типом иммунного ответа на вакцинацию против кори. В подгруппе А авидность антител колебалась от 27,5 до 51,1% (медиана 39,8%), а в подгруппе Б — от 73,6 до 88,3% (медиана 82,8%).

Важно отметить, что 18 из 20 серонегативных человек, не имевших до вакцинации и специфического клеточного иммунитета, ответили на прививку первичным типом иммунного ответа. Более того, в подгруппу А с первичным типом иммунного ответа попали 3 из 5 первоначально серонегативных человек, имевших сомнительный уровень специфического клеточного ответа на вирус кори и 3 также серонегативных, но имевших специфический клеточный ответ на антигены вируса кори до вак-

цинации. Два человека, не имевших ни гуморального, ни клеточного иммунитета к вирусу кори до вакцинации ответили на прививку вторичным типом иммунного ответа.

Специфический клеточный иммунный ответ на антигены вируса кори был обнаружен у 47 из 50 обследованных. У 3 человек специфический клеточный иммунный ответ был расценен как сомнительный (до вакцинации эти люди не имели специфического клеточного иммунного ответа на антигены кори). Все остальные люди, не имевшие до вакцинации специфического клеточного иммунного ответа на антигены вируса кори, и те, чей ответ был исходно расценен как сомнительный, после вакцинации продемонстрировали хороший уровень специфического клеточного иммунного ответа, по уровню равный ответу, который был у лиц, которые исходно имели клеточный иммунный ответ к вирусам кори (рис. 2). Группа обследованных, имевших специфический клеточный иммунный ответ к антигенам вируса кори еще до вакцинации, продемонстрировала значимое повышение этого показателя после вакцинации ($p < 0,05$). Интересно, что из 3 человек, продемонстрировавших сомнительный уровень специфического клеточного иммунного ответа после вакцинации, у одного был невысокий, но защитный уровень антител, а два других имели высокий уровень антител к вирусу кори. При этом все они ответили на прививку первичным типом иммунного ответа.

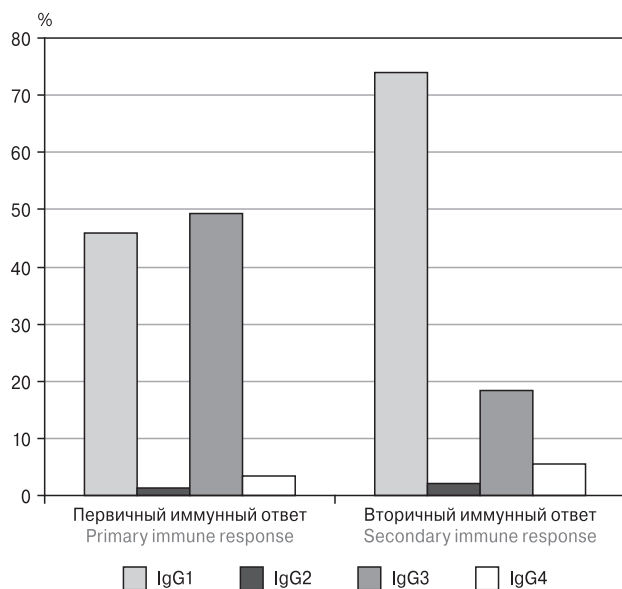
**Рисунок 1. Спектр субклассов противокоревых IgG-антител у первоначально серонегативных взрослых через 6 недель после прививки (в процентах от общего противокорьевого IgG)**

Figure 1. The subclasses' spectrum of anti-measles IgG antibodies in initially seronegative adults in the 6 weeks after vaccination (as a percentage of total measles IgG)

Обсуждение

В результате проведенного исследования было показано, что у части молодых взрослых, серонегативных к антигенам вируса кори, имеется специфический клеточный иммунитет к этому вирусу. Это свидетельствует о том, что эти люди были привиты от кори в детстве, но в процессе жизни утратили гуморальный и сохранили клеточный иммунитет к вирусу кори. Это наблюдение позволяет думать, что клеточный и гу-

моральный иммунный ответы против вирусов кори сохраняются многие годы независимо друг от друга, внося каждый свой вклад в защиту организма от инфекции. Более того, после прививки против кори выявлено 4 возможных сочетания специфического клеточного и гуморального иммунного ответа: 1) с высоким уровнем антител и специфических Т-клеток; 2) с низким, но защитным уровнем антител, и специфических Т-клеток; 3) сочетание высокого уровня антител и невысокого уровня специфических Т-клеток и 4) сочетание низкого, но защитного уровня антител и высокого уровня специфических Т-клеток. Такое распределение свидетельствует о том, что клеточный и гуморальный иммунный ответ против вирусов кори формируются также независимо друг от друга. Следует подчеркнуть, что все 50 изначально серонегативных людей после вакцинации против кори сформировали защитные уровни специфических антител и специфический клеточный иммунитет (в последнем случае 3 человека ответили слабо, но все-таки ответили). По-видимому, есть генетическая предрасположенность к превалированию гуморального или клеточного типа иммунного ответа на конкретный антиген. Возможно, это связано с конкретными HLA-антигенами данного человека, так как они отвечают за презентацию вирусного антигена Т-клеткам, а В-клетки в такой презентации не нуждаются [20]. Возможно, свою лепту вносят индивидуальные различия в уровнях продукции ключевых цитокинов [17].

Интересные результаты были получены при анализе спектра субклассов специфических IgG. 18 из 20 человек, не имевших до прививки ни гуморального, ни клеточного иммунитета против вируса кори, ответили первичным типом иммунного ответа. По-видимому, эти люди не были привиты в детстве от кори. 23 из 26 человек изначально серонегативных, но имевших специфический клеточный иммунитет против вирусов кори ответили по вторичному типу. Эти люди были привиты от кори в детстве, но утратили в процессе жизни защитные антитела. Однако у них сохранились специфические цитотоксические Т-лимфоциты, обеспечивавшие клеточный иммунитет к вирусу кори и, по-видимому, у них сохранились В-клетки памяти. Эти клетки никак не проявляют себя, пока есть защитные антитела и нет встречи с вирусом. Но со времени вакцинации в детстве они несут перестроенные рецепторы, преимущественно IgG1-субкласса. Поэтому, при проведенной нами вакцинации (а для этой когорты — ревакцинации), В-клетки памяти быстро активировались, воссоздали популяцию плазматических клеток с уже перестроенным рецептором, которые быстро начали синтезировать специфические антитела преимущественно IgG1-субкласса.

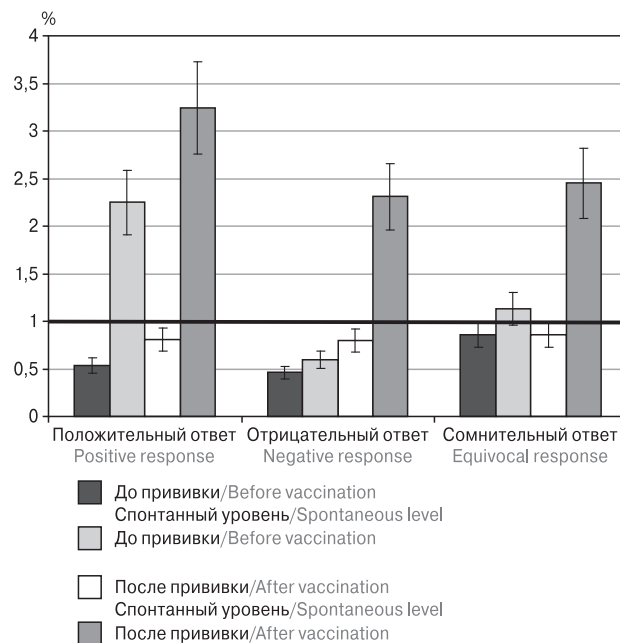


Рисунок 2. Экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах в ответ на антигены вирусов кори до и через 6 недель после прививки у первоначально серонегативных взрослых (в процентах от общего количества CD8^{hi})

Figure 2. Expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes in response to measles virus antigens before and 6 weeks after vaccination in initially seronegative adults (as a percentage of total CD8^{hi})

Примечание. Жирной линией показан уровень спонтанной дегрануляции 1%.

Note. The bold line shows the level of spontaneous degranulation of 1%.

Эти два варианта ответа на вакцинацию можно назвать типичными. Важно понять, почему несколько человек ответили нетипично. Так два человека, не имевших до прививки ни гуморального, ни клеточного иммунитета против вируса кори, ответили на вакцинацию вторичным типом иммунного ответа. Эта ситуация возможна, если предположить, что они были вакцинированы в детстве, но за время жизни потеряли специфический клеточный иммунитет и антитела к вирусу кори. При этом у них сохранились специфические В-клетки памяти. После нашей вакцинации они ответили на вирус синтезом IgG1-антител (вторичный тип), а клеточный иммунитет сформировался заново, поскольку Т- и В-клеточный иммунный ответы развиваются, во многом, параллельно и независимо. Примерно такая же ситуация сложилась у одного изначально серонегативного, и имевшего сомнительный (очень слабый) клеточный ответ. Он, очевидно, был привит в детстве, потерял в процессе жизни антитела, да и от специфического Т-клеточного иммунитета остались следы, но сохранились

В-клетки памяти. После нашей вакцинации (ревакцинации) В-клетки памяти ответили IgG1-антителами, а оставшиеся Т-клетки памяти продемонстрировали бустер-эффект.

Особый интерес представляют 3 человека, у которых изначально не было антител, но был хороший Т-клеточный ответ на вирус кори. Сюда же следует отнести еще двух человек, не имевших антител, но демонстрировавших слабый (сомнительный) Т-клеточный ответ. Наличие специфического клеточного иммунитета позволяет думать, что все эти люди были вакцинированы в детстве, однако ответили они на нашу вакцинацию первичным типом иммунного ответа. По-видимому, эти люди в процессе своей жизни потеряли не только антитела, но и В-клетки памяти, тогда как специфический Т-клеточный ответ на вирус кори сохранился в большей или меньшей степени. После нашей вакцинации В-клеточное звено иммунитета запустило иммунный ответ *de novo*, то есть ответило первичным типом с преимуществом IgG3-субкласса антител, а более-менее сохранное Т-клеточное звено просто бустировало в ответ на антиген.

Таким образом, мы видим, что в группе серонегативных к антигенам вируса кори взрослых существует несколько подгрупп. По спектру субклассов IgG-антител, образовавшихся после прививки и наличию специфического Т-клеточного иммунного ответа на антигены вируса кори до вакцинации мы условно разделили их на вакцинированных в детстве (32 человека) и не вакцинированных (18 человек). Тем не менее у 60% лиц, отнесенных нами в группу не привитых, имелись сведения о прививке в детстве, причем двукратной, как положено по российскому календарю. Как это может быть объяснено? Поскольку все эти люди ответили на нашу вакцинацию выработкой антител и появлением специфического Т-клеточного иммунитета, мы не можем думать, что они относятся к группе первичных вакцинальных неудач (когда ответа на прививку вовсе нет). Возможно, часть из них относится к группе вторичных вакцинальных неудач, когда специфический ответ на прививку формируется, но быстро пропадает. Однако по статистике таких людей не так

много (около 5%). Следует помнить, что вакцинацию против кори проводят в возрасте 1 год, когда иммунная система ребенка находится еще в начальной стадии своего созревания [13]. Эти процессы идут неодинаково у разных людей, поэтому возможны проблемы с формированием долговременной иммунологической памяти. Ревакцинация должна проводиться в 6 лет, когда иммунная система уже лучше сформирована, но, к сожалению, это не всегда выполняется. Вероятно, что часть этих людей была привита с нарушениями или некачественной вакциной. Это люди, родившиеся в 90-е гг. прошлого века. В это время наша медицина, как и вся страна, испытывала серьезные трудности с финансированием. И, наконец, возможно, что указания о прививке не соответствовали реальности, что, увы, иногда случается.

Наши исследования показали, что вакцинация против кори серонегативных взрослых дает высокий уровень специфических антител как у впервые вакцинированных, так и у вакцинированных в детстве, но потерявших защитные антитела. Среди 50 привитых не было выявлено ни одного случая реакций на прививку. Результаты проведенного исследования поднимают вопрос о необходимости контроля уровня антител против вируса кори среди школьников 10–11 классов и ревакцинации выявленных серонегативных. После окончания школы эти люди активно перемещаются по стране (поступают в университеты в других городах, призываются в армию, едут на работу в другие регионы). Контакты с диким вирусом, в случае утраты защитных антител, чреватые очередными вспышками, особенно в тесно сплоченных коллективах (армия, студенческие коллективы). С другой стороны, наше исследование продемонстрировало, что даже первичный ответ на коревую вакцину у взрослых дает высокие уровни антител. Это дает надежду, что в случае вакцинации серонегативных одиннадцатиклассников, мы сможем иметь высокий процент иммунной прослойки среди взрослых. К аналогичным выводам о необходимости третьей дозы вакцинации пришли независимые исследователи, изучавшие проблему уровня серонегативных среди людей разного возраста [3, 5, 7].

Список литературы/References

1. Голева О.В., Самойлова И.Г., Мурина Е.А., Мундруева А.А. Особенности противокорьевого иммунитета у населения Санкт-Петербурга // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 6. С. 25–29. [Goleva O.V., Samoilova I.G., Murina E.A., Mundrueva A.A. Features of measles immunity in the population of Saint Petersburg. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2012, no. 6, pp. 25–29. (In Russ.)]
2. Готвянская Т.П., Ноздрачева А.В., Русакова Е.В., Евсеева Л.Ф., Николаева О.Г., Полонский В.О., Семенов Т.А. Состояние популяционного иммунитета в отношении инфекций, управляемых средствами специфической профилактики у медицинских работников (по материалам банка сывороток крови) // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. № 3. С. 8–16. [Gotvyanskaya T.P., Nozdracheva A.V., Rusakova E.V., Evseeva L.F.,

- Nikolaeva O.G., Polonsky V.O., Semenenko T.A. Herd immunity against vaccine-preventable diseases among healthcare workers (according to serum bank materials). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues*, 2016, no. 3, pp. 8–16. (In Russ.)]
3. Костинов М.П., Шмитко А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Полищук В.Б., Рыжова А.А., Черданцев А.П. Необходима ли третья доза вакцины против кори — взгляд иммунолога // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 88–94. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Solovieva I.L., Savisko A.A., Polischuk V.B., Ryzhov A.A., Cherdantsev A.P. Is a third dose of measles vaccine necessary — an immunologist's view. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 2016, no. 5, pp. 88–94. (In Russ.)]
 4. Ноздрачева А.В., Рыбин В.В., Грицик А.А., Заволожин В.А., Кузин С.Н., Семенов Т.А. Распространенность антител к вирусам кори, краснухи и эпидемическому паротиту у военнослужащих // Военно-медицинский журнал. 2018. Т. 339, № 1. С. 66–70. [Nozdracheva A.V., Rybin V.V., Gritsik A.A., Zavolozhin V.A., Kuzin S.N., Semenenko T.A. Prevalence of antibody to measles, rubella, and epidemic parotitis in military personnel. *Voенно-meditsinskiy zhurnal = Military Medical Journal*, 2018, vol. 1, pp. 66–70. (In Russ.)]
 5. Сармометов Е.В., Мокова Н.М., Вольдшмидт Н.Б., Сергевнин В.И., Цвиркун О.В., Метелкина Н.А. Оценка напряженности противокорьевого иммунитета у медицинских работников г. Перми // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 4. С. 45–48. [Sarmometov E.V., Mokova N.M., Voldshmidt N.B., Sergevnin V.I., Tsvirkun O.V., Metelkina N.A. Evaluation of measles immunity intensity among medical workers in the city of Perm. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2011, no. 4, pp. 45–48. (In Russ.)]
 6. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 607–611. [Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Y.Y., Sennikova S.V., Zetkin A.Y., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 607–611. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611 (In Russ.)]
 7. Сылка О.И., Харсеева Г.Г., Леонова И.А. Напряженность иммунитета к вирусу кори у населения г. Ростова-на-Дону // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2013. № 1. С. 41–43. [Immunity stress for measles viruses in the population of Rostov-on-Don. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii = Journal of Fundamental Medicine and Biology*, 2013, no. 1, pp. 41–43. (In Russ.)]
 8. Топтыгина А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 1. С. 7–14. [Toptygina A.P. Common mechanisms of specific humoral immune response' shaping and sustaining by the example of immune response to measles and rubella viruses. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 7–14. doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-7-14 (In Russ.)]
 9. Топтыгина А.П., Алешкин В.А. Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс» // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 4. С. 359–364. [Toptygina A.P., Alioshkin V.A. Comparison of the primary and secondary humoral immune response to vaccination by “Priorix”. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 359–364. doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-359-364 (In Russ.)]
 10. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А. Динамика синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13 (22), № 1. С. 78–85. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A. Dynamics of synthesis and circulation of subclasses specific IgG in the immune response to the vaccine against measles, rubella, mumps. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, vol. 13 (22), no. 1, pp. 78–85. doi: 10.31857/S102872210005024-1 (In Russ.)]
 11. Топтыгина А.П., Пухальский А.Л., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь // Бюллетень экспериментальной биологии. 2004. Т. 137, № 3. С. 293–295. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A., Pukhalskii A.L. Spectrum of anti-measles immunoglobulin G subclasses in convalescents after measles. *Vyulyuten' eksperimental'noy biologii = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 259–261. doi: 10.1023/B:BEVM.0000031564.27747.b4 (In Russ.)]
 12. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс» // Иммунология. 2013. Т. 34, № 5. С. 257–261. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 5, pp. 257–261. (In Russ.)]
 13. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 289–294. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alioshkin V.A. Age-dependent features of evolving humoral immunity in children. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 289–294. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-289-294 (In Russ.)]
 14. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 341–348. [Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 341–348. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348 (In Russ.)]
 15. Augusto G.F., Silva A., Pereira N., Fernandes T., Leça A., Valente P., Calé E., Aguiar B.A., Martins A., Palminha P., Vinagre E., Cordeiro R., Lopo S., Nogueira P.J. Report of simultaneous measles outbreaks in two different health regions in Portugal, February to May 2017: lessons learnt and upcoming challenges. *Euro Surveill.*, 2019, vol. 24, no. 3: 1800026. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800026

16. Filia A., Bella A., Del Manso M., Baggieri M., Magurano F., Rota M.C. Ongoing outbreak with well over 4,000 measles cases in Italy from January to end August 2017 — what is making elimination so difficult? *Euro Surveill.* 2017, vol. 22, no. 37: 30614. doi: 10.2807/15607917.ES.2017.22.37.30614
17. Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Vierkant R.A., Shane Pankratz V., Jacobson R.M., Poland G.A. Associations between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in cytokine and cytokine receptor genes and immunity to measles vaccination. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 45, pp. 7883–7895. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.083
18. Lisowski B., Yuwan S., Bier M. Outbreaks of the measles in the Dutch Bible Belt and in other places — new prospects for a 1000 year old virus. *Biosystems*, 2019, vol. 177, pp. 16–23. doi: 10.1016/j.biosystems.2019.01.003
19. Orsoo O., Saw Y.M., Sreenen E., Yadamsuren B., Byambaa A., Kariya T., Yamamoto E., Hamajima N. Epidemiological characteristics and trends of a Nationwide measles outbreak in Mongolia, 2015–2016. *BMC Public Health.*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 201. doi: 10.1186/s12889-019-6511-0
20. Ovsyannikova I.G., Ryan J.E., Vierkant R.A., Pankratz V.S., Jacobson R.M., Poland G.A. Immunologic significance of HLA class I genes in measles virus-specific IFN-gamma and IL-4 cytokine immune responses. *Immunogenetics*, 2005, vol. 57, pp. 828–836. doi: 10.1007/s00251-005-0061-6
21. Priya R. Varun N., Vivek S., Sanjay K., Avinash K., Noore S., Rohini, and Veena G K. Measles outbreak in the adolescent population — matter of concern? *J. Clin. Diagn. Res.*, 2017, vol. 11 (8), pp. LC20–LC23. doi: 10.7860/JCDR/2017/28619.10488
22. Tischer A., Gassner M., Richard J.-L., Suter-Riniker F., Mankertz A., Heininger U. Vaccinated students with negative enzyme immunoassay results show positive measles virus-specific antibody levels by immunofluorescence and plaque neutralization test. *J. Clin. Virol.*, 2007, vol. 38, pp. 204–209. doi: 10.1016/j.jcv.2006.12.017
23. World Health Organization Regional Office for Europe (WHO/Europe). Fifth Meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) 24–26 October 2016, Copenhagen, Denmark. *Copenhagen: WHO/Europe*. URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/330917/5th-RVC-meeting-report.pdf?ua=1

Авторы:

Топтыгина А.П., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Андреев Ю.Ю., аспирант ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Смердова М.А., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Зеткин А.Ю., начальник организационно-планового отдела, зам. начальника ФГКУ Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ, Москва, Россия;

Клыкова Т.Г., врач-эпидемиолог ФГКУ Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ, Москва, Россия.

Authors:

Topptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cytokine, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Andreev Yu.Yu., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Smerdova M.A., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zetkin A.Yu., Head of Organizational Planning Department, Deputy Head of Main Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision (of Special Purpose), Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Klykova T.G., Epidemiologist, Main Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision (of special purpose), Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.12.2019
Отправлена на доработку 16.01.2020
Принята к печати 28.01.2020

Received 16.12.2019
Revision received 16.01.2020
Accepted 28.01.2020

ОСОБЕННОСТИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ И ГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Л.Ф. Зайнетдинова, Л.Ф. Телешева, А.В. Коряушкина

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МР РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. *Введение.* Наружный генитальный эндометриоз — воспалительное эстрогензависимое заболевание, которое характеризуется имплантацией и разрастанием эндометриальной ткани вне полости матки, сопровождается повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, простагландинов, компонентов комплемента, гидролитических ферментов, усилением процессов ангиогенеза и аномалиями эктопического эндометрия. Согласно имплантационной теории, наружный генитальный эндометриоз развивается из жизнеспособных клеток эндометрия, перенесенных ретроградно через маточные трубы в брюшную полость во время менструации, при этом нарушение местного иммунитета является важным фактором патогенеза данного заболевания. В формировании иммунной среды перитонеальной полости у женщин с эндометриозом могут участвовать генитальные патогены. Цель — изучить особенности местного иммунитета у женщин с наружным генитальным эндометриозом и возбудителями генитальной инфекции. *Материалы и методы.* Обследовано 159 женщин с наружным генитальным эндометриозом. Определяли общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание жизнеспособных клеток, количество нейтрофилов, макрофагов, их функциональную активность, уровень IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN α , IFN γ , TNF α в перитонеальной жидкости. Исследование местного иммунитета проводили у женщин с 1–2 и 3–4 стадиями эндометриоза, а также в зависимости от наличия возбудителей генитальной инфекции. В эндометрии, перитонеальной жидкости и эндометриоидных гетеротопиях определяли методом ПЦР *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*, HSV1,2/CMV, HPV высокого канцерогенного риска (ВКР). Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ статистического анализа IBM SPSS Statistics Version 22.2. *Результат.* При наличии HPV ВКР и *Ureaplasma* spp. у женщин с 1–2 стадиями наружного генитального эндометриоза снижалась функциональная активность перитонеальных нейтрофилов и макрофагов. При 3–4 стадиях НГЭ по данным корреляционного анализа наличие HPV ВКР и *Ureaplasma* spp. характеризовалось повышением как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в перитонеуме, однако более высокая активность Th-2 клеток в перитонеальной жидкости, секретирующих IL-4 и IL-10 и подавляющих клеточный иммунитет, наблюдалась при HPV ВКР. Кроме этого, наличие HPV ВКР коррелировало со снижением IL-2 и IL-4. *Выводы.* Наиболее выраженные изменения иммунологических показателей перитонеальной жидкости фиксируются при наличии возбудителей генитальной инфекции и, особенно, — HPV ВКР. Формирующиеся на фоне бактериальных и вирусных возбудителей иммунные нарушения могут способствовать имплантации эндометриальных клеток на органах малого таза и прогрессированию заболевания.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, местный иммунитет, вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска, уреаплазменная инфекция.

Адрес для переписки:

Коряушкина Анна Владимировна
454052, Россия, г. Челябинск, ул. Черкасская, 2,
клиника ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный
медицинский университет.
Тел.: 8 908 047-62-67 (моб.). Факс: 8 (351) 721-82-44.
E-mail: koryaushkinaanna@yandex.ru

Contacts:

Anna V. Koryaushkina
454052, Russian Federation, Chelyabinsk, Cherkasskaya str., 2,
Clinics of South Ural State Medical University.
Phone: +7 908 047-62-67 (mobile). Fax: +7 (351) 721-82-44.
E-mail: koryaushkinaanna@yandex.ru

Библиографическое описание:

Зайнетдинова Л.Ф., Телешева Л.Ф., Коряушкина А.В. Особенности местного иммунитета у женщин с эндометриозом и генитальной инфекцией // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 145–158. doi: 10.15789/2220-7619-FOL-1192

Citation:

Zaynetdinova L.F., Telesheva L.F., Koryaushkina A.V. Features of local immunity in women with endometriosis and genital infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 145–158. doi: 10.15789/2220-7619-FOL-1192

FEATURES OF LOCAL IMMUNITY IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS AND GENITAL INFECTION**Zaynetdinova L.F., Telesheva L.F., Koryaushkina A.V.***South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

Abstract. Introduction. External genital endometriosis is an inflammatory estrogen-dependent disease characterized by implantation and proliferation of endometrial tissue outside the uterus, accompanied by increased production of pro-inflammatory cytokines, prostaglandins, components of the complement, hydrolytic enzymes, increased angiogenesis and anomalies of ectopic endometrium. According to implantation theory, external genital endometriosis develops from viable endometrial cells transferred retrogradely through the fallopian tubes to the abdominal cavity during menstruation, while a disturbed local immunity is an important factor in its pathogenesis. Genital pathogens may be involved in the formation of the immune environment of the peritoneal cavity in women with endometriosis. **Purpose.** To study the peculiarities of local immunity in women with external genital endometriosis and genital infection pathogens. **Materials and methods.** 159 women with external genital endometriosis were examined. The total number of leukocytes, the absolute and relative number of viable cells, counts of neutrophils, macrophages and their functional activity, the level of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN α , IFN γ , TNF α in the peritoneal fluid were evaluated. The study of local immunity was performed in women with endometriosis, stage 1–2 and 3–4, depending on detected genital pathogens. *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*, HSV1,2/CMV, high carcinogenic risk HPV were analyzed by using PCR in samples collected from the endometrium, peritoneal fluid, and endometrioid heterotopies. Statistical processing was performed by using the IBM SPSS Statistics Version 22.2 statistical analysis software package. **Results.** In the presence of HPV and *Ureaplasma* spp. in women with endometriosis, stage 1–2, the decreased functional activity of peritoneal neutrophils and macrophages was found. At 3–4 stage, a correlation analysis revealed that detected HPV and *Ureaplasma* spp. obtained increased both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the peritoneum. However, the higher activity of Th-2 cells in the peritoneal fluid secreting IL-4 and IL-10 and suppressing cellular immunity, was observed in HPV-positive samples. In addition, HPV also correlated with a decreased IL-2 and IL-4 levels. **Conclusions.** The most prominent changes in the immunological parameters from peritoneal fluid samples were observed in case of detected genital infection pathogens, particularly HPV. Thus, immune disturbances emerged upon bacterial and viral pathogen detection may contribute to the implantation of endometrial cells in the pelvic organs and disease progression.

Key words: external genital endometriosis, local immunity, human papillomavirus of high oncogenic risk, ureaplasma infection.

Введение

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) — воспалительное эстрогензависимое заболевание, которое характеризуется имплантацией и разрастанием эндометриальной ткани вне полости матки, сопровождается повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, простагландинов, компонентов комплемента, гидролитических ферментов, усилением процессов ангиогенеза, аномалиями эктопического эндометрия и нарушением функции клеточноопосредованного иммунитета [22]. Это многофакторное заболевание, причины которого до настоящего времени не выяснены. Согласно имплантационной теории, эндометриоз развивается из жизнеспособных клеток эндометрия, смещенных в толщу стенки матки или перенесенных ретроградно через маточные трубы в брюшную полость во время менструации [25]. Имплантация и выживание эндометриоидных очагов вне полости матки возможны при молекулярно-генетических дефектах самой ткани эндометрия, иммунологических нарушениях, заключающихся в неспособности перитонеальных макрофагов элиминировать клетки эндометрия, попавшие в брюшную полость, либо при первичной патологии брюшины [7, 21]. Kobayashi H. и соавт. высказали предположение,

что внутриматочная инфекция может инициировать развитие эндометриоза путем активации провоспалительных путей и врожденного иммунитета [18]. Oppelt P. и соавт. в очагах эндометриоза находили ВПЧ высокого и среднего канцерогенного риска (HPV ВКР) в 11,3% случаев [23]. По данным Vestergaard A.L. и соавт. HPV был обнаружен в эутопическом эндометрии у 3% женщин с эндометриозом. При этом в эктопическом эндометрии вирусы не выявлялись [30]. В исследовании Heidarpour M. et al. у женщин с эндометриозом яичников HPV ВКР был идентифицирован в 26% случаев [15]. Микроорганизмы класса *Mollicutes* были идентифицированы в эндометриоидных гетеротопиях [14].

Нарушение местного иммунитета является важным фактором в патогенезе наружного генитального эндометриоза. В формировании иммунной среды перитонеальной полости у женщин с эндометриозом могут участвовать генитальные патогены. По данным А.А. Савченко и соавт. наличие HPV вызывает изменения в иммунной системе: снижение содержания CD4⁺ лимфоцитов, НК-клеток, повышение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов [4]. При наличии у женщин с эндометриозом *Mycoplasma genitalium* установлено повышение продукции IFN γ и IL-1 β [14].

Активация инфекционными агентами иммунных клеток может усиливать ангиогенез, нейrogenез и лимфоангиогенез, что способствует росту эктопической эндометриальной ткани. Воспаление играет большую роль в развитии боли и бесплодия при эндометриозе, а также ведет к развитию перитонеальных повреждений [20].

Очаги эндометриоза формируются на фоне локальной гиперэстрогении. По данным литературы репродукция ВПЧ индуцирует образование агрессивного метаболита эстрадиола (16 α -ОН) в инфицированных клетках. 16 α -ОН образует комплекс с эстрогеновыми рецепторами и активирует гены E6 и E7 ВПЧ, ответственные за синтез белков E6 и E7, что ведет к развитию опухолевого роста [1, 2].

Несмотря на множество теорий развития эндометриоза, этиология этого заболевания окончательно не ясна. Нарушения иммунитета занимают ведущее место в развитии генитального эндометриоза, однако не известно, имеются ли они изначально или развиваются при прогрессировании заболевания.

Цель исследования: изучить особенности местного иммунитета у женщин с наружным генитальным эндометриозом на фоне генитальных инфекций.

Материалы и методы

За период с 2015 по 2018 гг. было обследовано 159 женщин с наружным генитальным эндометриозом, поступивших в гинекологическое отделение Клиники ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России для проведения оперативного лечения. У всех женщин изучены данные анамнеза, проведено физикальное обследование, гинекологический осмотр, УЗИ органов малого таза, клиничко-лабораторное исследование. Диагноз был установлен во время лечебно-диагностической лапароскопии, с обязательным гистологическим подтверждением (материал для гистологического исследования — капсулы эндометриоидных кист яичников, инфильтраты, «малые» формы эндометриоза). Лечебно-диагностическую лапароскопию выполняли под эндотрахеальным наркозом с использованием эндовидеохирургического оборудования фирмы «Karl Storz» (Германия). Во время операции осматривали органы брюшной полости и малого таза. Для оценки степени тяжести эндометриоза использовали классификацию Американского общества по репродуктивной медицине (R-AFS, 1996) [8]. Оперативное лечение проводилось в пролиферативную фазу менструального цикла. Пайпель-биопсию эндометрия для ПЦР диагностики проводили во время лапароскопии.

Забор перитонеальной жидкости производили во время лапароскопии сразу после введения троакаров с помощью троакарной иглы в количестве 2,0–10,0 мл, в стерильный контейнер и в течение 2 ч при комнатной температуре доставляли в иммунологическую лабораторию. Для оценки показателей местного иммунитета был изучен состав и функциональная активность лейкоцитов перитонеальной жидкости. Определяли общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание жизнеспособных клеток в перитонеальной жидкости, количество нейтрофилов, макрофагов, уровень IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN α , IFN γ , TNF α . Функциональную активность нейтрофилов и макрофагов перитонеальной жидкости, изучали по способности клеток к захвату частиц полистерольного латекса (Фрейдлин И.С., 1986). Исследование внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов осуществляли с использованием НСТ-теста в модификации А.Н. Маянского и М.Е. Виксмана (1979). Параллельно с помощью НСТ-теста определяли способность нейтрофилов и макрофагов перитонеальной жидкости отвечать повышением метаболической активности на стимуляцию частицами латекса. Лизосомальную активность фагоцитов определяли по числу лизосом и интенсивности люминисценции лизосом в цитоплазме клеток, окрашенных акридиновым оранжевым. Уровни содержания цитокинов перитонеальной жидкости оценивали с использованием наборов «Цитокин-Стимул-Бэст» с помощью автоматического ИФА-анализатора «PersonalLab» (ADALTI, Италия).

Исследование местного иммунитета проводили у женщин с 1–2 стадиями (n = 69) и с 3–4 стадиями (n = 90) НГЭ, а также в зависимости от наличия возбудителей генитальной инфекции в эндометрии, перитонеальной жидкости и эндометриоидных гетеротопиях.

Критериями включения в исследование являлись: информированное согласие пациентки, оформленное в письменном виде, наружный генитальный эндометриоз, подтвержденный гистологическим исследованием операционного материала, репродуктивный возраст пациенток (18–45 лет), наличие возбудителей генитальной инфекции. Критериями исключения были: отказ от участия в исследовании, беременность, тяжелая соматическая патология в стадии суб- и декомпенсации, онкологические заболевания, туберкулез, ВИЧ-инфекция. Группу контроля составили 14 практически здоровых женщин репродуктивного возраста, поступивших для проведения хирургической стерилизации.

Экстракция ДНК из клинического материала (эндометрий, перитонеальная жидкость,

Таблица 1. Возбудители генитальной инфекции, выявленные при ПЦР диагностике из обследованных локализаций

Table 1. The causative agents of genital infection identified by PCR diagnosis of the examined sites

Возбудители генитальной инфекции Causative agents of genital infection	1–2 стадии НГЭ 1–2 stages of endometriosis n = 69	3–4 стадии НГЭ 3–4 stages of endometriosis n = 90
	n (%)	n (%)
Возбудители генитальной инфекции обнаружены (всего) Causative agents of genital infection detected (total)	27 (39,1%)	46 (51,1%)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	2 (2,2%)
<i>Ureaplasma spp./Mycoplasma genitalium</i>	16 (23,2%)	27 (30%)
HPV ВКР	13 (18,8%)	22 (24,4%)
HSV-1,2	3 (4,3%)	3 (3,3%)
CMV	11 (15,9%)	13 (14,4%)

очаги эндометриоза) осуществлялась с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификационная часть исследования проводилась с помощью тест-систем «АмплиСенс® С. trachomatis/Ureaplasma/M. genitalium — Мультипрайм-FL», «АмплиСенс® HSV/CMV — Мультипрайм-FL», «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) на детектирующих амплификаторах «ДТ-96» (НПФ «ДНК-технология», Россия) и «Rotor-Gene-6000» (Corbett Research, Австралия) в режиме реального времени.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ прикладного статистического анализа IBM SPSS Statistics Version 22.2. Для оценки достоверности полученных значений применяли непараметрические методы статистического анализа с расчетом медианы, минимальной и максимальной величины. Различия показателей определяли с помощью критерия Манна-Уитни и признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В группе женщин с НГЭ средний возраст пациенток составил $31,2 \pm 0,4$ год: с 1–2 стадиями — $31,2 \pm 0,6$ год, с 3–4 стадиями — $31,3 \pm 0,6$ год. Средний возраст женщин в группе контроля был $30,8 \pm 1,5$ лет. Достоверных отличий между группами не найдено.

При 1–2 стадиях НГЭ в исследуемом материале возбудители генитальной инфекции были выделены в 27 (39,1%) случаях (в 23 (33,3%) — в эндометрии, в 2 (2,9%) — в перитонеальной жидкости и в 8 (11,6%) случаях в эндометриоидных гетеротопиях), при 3–4 стадиях — в 46 (51,1%) случаях (в 44 (48,8%) — в эндометрии, в 3 (3,3%) — в перитонеальной жидкости и в 12

(13,3%) случаях в эндометриоидных гетеротопиях). Данные представлены в таблице 1.

Наиболее часто среди изучаемых микроорганизмов были обнаружены HPV ВКР и *Ureaplasma spp.*

Для проведения анализа иммунологических показателей среди пациенток с 1–2 стадиями НГЭ было выделено 3 группы: 1 группа — пациентки с НГЭ, у которых не выделены возбудители генитальной инфекции ($n = 18$); 2 группа — пациентки с НГЭ и HPV ВКР ($n = 13$); 3 группа — пациентки с НГЭ и *Ureaplasma spp.* ($n = 12$); контрольную, четвертую, группу составили здоровые женщины репродуктивного возраста ($n = 14$) (табл. 2).

Уровень лейкоцитов перитонеальной жидкости существенно не менялся во всех исследуемых группах при сравнении с контролем. У женщин 1 группы в сравнении с контрольной группой выявлено снижение относительного количества жизнеспособных лейкоцитов ($p = 0,02$) и повышение НСТ индуцированной активности ($p = 0,04$) и интенсивности ($p = 0,03$) перитонеальных макрофагов.

При 1–2 стадиях в группе НГЭ и HPV ВКР наблюдалось снижение относительного количества жизнеспособных клеток ($p = 0,01$), как и в 1 группе. Кроме этого, снижалась интенсивность фагоцитоза макрофагов ($p = 0,03$) по сравнению с контрольной группой.

При наличии *Ureaplasma spp.* у пациенток с 1–2 стадиями НГЭ количество жизнеспособных клеток перитонеальной жидкости и функциональная активность перитонеальных макрофагов достоверно не изменялась.

Сравнительный анализ результатов среди женщин с 1–2 стадиями НГЭ показал при наличии HPV ВКР снижение, по сравнению с 1 группой, спонтанной НСТ активности ($p = 0,01$) и интенсивности ($p = 0,01$) нейтрофилов, индуцированной НСТ активности нейтрофилов ($p = 0,04$), спонтанной НСТ активности ($p < 0,01$) и интен-

Таблица 2. Показатели функциональной активности нейтрофилов и макрофагов перитонеальной жидкости пациенток с 1–2 стадиями наружного генитального эндометриоза

Table 2. Indicators of functional activity of neutrophils peritoneal fluid of patients with 1–2 stages of endometriosis

Показатели перитонеальной жидкости Indicators of peritoneal fluid	1 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза, возбудители генитальной инфекции не выделены 1 group Patients with 1–2 stages of endometriosis, genital pathogens are not isolated n = 18	2 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза и HPV ВКР 2 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and HPV n = 13	3 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma</i> spp. 3 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma</i> spp. n = 12	4 группа Контрольная группа здоровых женщин 4 group Control group of healthy women n = 14
	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /л	6,05 4,48–12,35	5,7 4,1–6,6	5 3,08–10,8	6,65 3,15–15,15
Жизнеспособность, % Viability, %	94* 81,5–98 p _{1/4} = 0,02	91* 85,0–95,5 p _{2/4} = 0,01	93 89,5–98	98* 95–99,25 p _{1/4} = 0,02 p _{2/4} = 0,01
Жизнеспособность, 10 ⁹ /л Vitality, 10 ⁹ /л	5,2 3,35–10,1	5,6 4–6,25	4,8 3,9–11,6	6,5 3,05–15
Лизосомальная активность нейтрофилов, у.е. Lysosomal activity of neutrophils, RU	171 71,0–215,0	124 49–191,5	118,0 94–124	212 97,5–262
НСТ-тест нейтрофилов спонтанный, % NBT-test neutrophil spontaneous, %	18** 12–26 p _{1/2} = 0,01 p _{1/3} = 0,02	8** 4,5–13 p _{1/2} = 0,01	10** 2–14 p _{1/3} = 0,02	10 8–19,5
НСТ-тест нейтрофилов спонтанный, у.е. NBT-test neutrophil spontaneous, RU	0,2** 0,14–0,4 p _{1/2} = 0,01 p _{1/3} = 0,02	0,1** 0,07–0,17 p _{1/2} = 0,01	0,1** 0,02–0,17 p _{1/3} = 0,02	0,15 0,85–0,225
НСТ-тест нейтрофилов индуцированный, % NBT-test neutrophil induced, %	26** 20–40 p _{1/2} = 0,04	14** 8–26,5 p _{1/2} = 0,04	18 12–28	20,5 14–24
НСТ-тест нейтрофилов индуцированный, у.е. NBT-test neutrophil induced, RU	0,3 0,22–0,52	0,18 0,1–0,35	0,22 0,12–0,34	0,23 0,185–0,335
Фагоцитарная активность нейтрофилов, % Phagocytic activity of neutrophils, %	42 40–48	39 32–43	42 39–47	42 33,75–45,0
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, у.е. The intensity of phagocytosis of neutrophils, RU	1,25 1,01–1,54	1,01 0,82–1,37	1,18 1,01–1,56	1,19 0,99–1,43

Окончание таблицы 2. Показатели функциональной активности нейтрофилов и макрофагов перитонеальной жидкости пациенток с 1–2 стадиями наружного генитального эндометриоза

Table 2. Indicators of functional activity of neutrophils peritoneal fluid of patients with 1–2 stages of endometriosis (continued)

Показатели перитонеальной жидкости Indicators of peritoneal fluid	1 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза, возбудители генитальной инфекции не выделены 1 group Patients with 1–2 stages of endometriosis, genital pathogens are not isolated n = 18	2 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза и HPV ВКР 2 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and HPV n = 13	3 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma</i> spp. 3 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma</i> spp. n = 12	4 группа Контрольная группа здоровых женщин 4 group Control group of healthy women n = 14
	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅
Фагоцитарное число нейтрофилов, у.е. Phagocytic number of neutrophils, RU	3,1 2,2–3,1	2,8 2,35–3,1	2,9 2,4–3,4	2,95 2,625–3,15
Лизосомальная активность макрофагов, у.е. Lysosomal activity of macrophages, RU	140 68,25–190	110 69–182,5	104,5 69,25–161,25	197 131–215
НСТ-тест макрофагов спонтанный, % NBT-test macrophage spontaneous, %	21** 11,75–29,25 p _{1/2} < 0,01 p _{1/3} = 0,03	8** 5–13 p _{1/2} < 0,01	12** 4,5–18 p _{1/3} = 0,03	15,5 8,5–21,5
НСТ-тест макрофагов спонтанный, у.е. NBT-test macrophage spontaneous, RU	0,24** 0,14–0,355 p _{1/2} = 0,02 p _{1/3} = 0,03	0,1** 0,05–0,19 p _{1/2} = 0,02	0,12** 0,045–0,22 p _{1/3} = 0,03	0,17 0,09–0,275
НСТ-тест макрофагов индуцированный, % NBT-test macrophage induced, %	37* ** 26–47,5 p _{1/2} < 0,01 p _{1/4} = 0,04	20** 11–22 p _{1/2} < 0,01	24 15,5–36,5	25* 18,25–36,5 p _{1/4} = 0,04
НСТ-тест макрофагов индуцированный, у.е. NBT-test macrophages induced, RU	0,47* ** 0,335–0,63 p _{1/2} < 0,01 p _{1/4} = 0,03	0,24 0,13–0,295 p _{1/2} < 0,01	0,29 0,16–0,51	0,29* 0,23–0,465 p _{1/4} = 0,03
Фагоцитарная активность макрофагов, % Phagocytic activity of macrophages, %	45 40–49,75	40 33–47,5	48 33,25–55	50 44,25–52
Интенсивность фагоцитоза макрофагов, у.е. Macrophage phagocytosis intensity, RU	1,39 0,98–1,54	1,29* 0,85–1,44 p _{2/4} = 0,03	1,45 0,7–2,63	1,57* 1,42–1,8 p _{2/4} = 0,03
Фагоцитарное число макрофагов, у.е. Phagocytic number of macrophages, RU	2,9 2,5–3,3	3,1 2,4–3,3	3,1 2,1–4,1	3,2 2,83–3,65

Примечание. p* — сравнение групп с эндометриозом и генитальной инфекцией и контрольной группы; p** — сравнение между группами с эндометриозом без генитальной инфекции и с генитальной инфекцией; у.е. — условные единицы.

Note. p* — comparison of groups with endometriosis and genital infection with the control group; p** — comparison between groups with endometriosis without genital infection and with genital infection; RU — relative units.

сивности ($p = 0,02$), а также индуцированной НСТ активности ($p < 0,01$) и интенсивности ($p < 0,01$) макрофагов. При наличии *Ureaplasma* spp., по сравнению с результатами в 1 группе, была снижена спонтанная НСТ активность ($p = 0,02$) и интенсивность ($p = 0,02$) нейтрофилов, а также спонтанная НСТ активность ($p = 0,03$) и интенсивность ($p = 0,03$) макрофагов.

Изменения цитокинов перитонеальной жидкости у женщин с 1–2 стадиями НГЭ представлены в таблице 3.

Уровень изучаемых цитокинов перитонеальной жидкости у пациенток 1 группы достоверно не отличался от контроля.

Во 2 группе женщин с 1–2 стадиями НГЭ и HPV ВКР наблюдалось значительное повыше-

ние IL-6 ($p < 0,01$), IL-8 ($p = 0,03$) и TNF α ($p = 0,03$).

У пациенток 3 группы, с *Ureaplasma* spp., отмечено повышение IL-8 ($p = 0,04$).

Сравнительный анализ результатов среди женщин с 1–2 стадиями НГЭ показал достоверные отличия при HPV ВКР — снижение IL-2 ($p < 0,01$) и IL-4 ($p = 0,02$) по сравнению с 1 группой.

По данным корреляционного анализа выявлено наличие обратной корреляции между наличием HPV ВКР и НСТ спонтанной ($r_s = -0,513$, $p = 0,007$, $n = 26$) и НСТ индуцированной ($r_s = -0,401$, $p = 0,042$, $n = 26$) активности нейтрофилов, НСТ спонтанной активности ($r_s = -0,523$, $p = 0,004$, $n = 29$) и интенсивности ($r_s = -0,424$, $p = 0,022$, $n = 29$), а также НСТ индуцированной активности ($r_s = -0,602$, $p < 0,001$,

Таблица 3. Уровни цитокинов перитонеальной жидкости у пациенток с 1–2 стадиями эндометриоза

Table 3. Cytokine levels of peritoneal fluid in patients with 1–2 stages of endometriosis

Показатели перитонеальной жидкости Indicators of peritoneal fluid	1 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза, возбудители генитальной инфекции не выделены 1 group Patients with 1–2 stages of endometriosis, genital pathogens are not isolated n = 18	2 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза и HPV ВКР 2 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and HPV n = 9	3 группа Пациентки с 1–2 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma</i> spp. 3 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma</i> spp. n = 11	4 группа Контрольная группа здоровых женщин 4 group Control group of healthy women n = 14
	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	11,28** 11,17–12,21 $p_{1/2} < 0,01$	10,94** 10,4–10,94 $p_{1/2} < 0,01$	11,2 9,5–13,6	11,21 10,40–11,48
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	3,59** 3,32–3,65 $p_{1/2} = 0,02$	3,14** 2,95–3,37 $p_{1/2} = 0,02$	3,25 2,8–4,1	3,43 3,18–5,04
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	99,86 73,22–950,89	329,3* 122,5–972,86 $p_{2/4} < 0,01$	116,3 45,2–281,6	51,368* 13,62–118,2 $p_{2/4} < 0,01$
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	31,54 4,23–496,9	60,48* 21,92–447,29 $p_{2/4} = 0,03$	216,8* 9,5–380,1 $p_{3/4} = 0,04$	3,57* 3,13–89,01 $p_{2/4} = 0,03$ $p_{3/4} = 0,04$
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	53,59 34,843,92	81,86 40,76–249,93	67,1 4,1–107,5	21,94 15,81–62,46
IL-12, пг/мл IL-12, pg/ml	3,02 2,86–3,37	2,76 2,57–3,22	2,94 2,7–3,4	2,79 2,39–3,02
TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	3,8 2,75–180,96	28,06* 7,15–596,43 $p_{2/4} = 0,03$	19,56 2,8–36,5	3,1* 2,28–12,74 $p_{2/4} = 0,03$
IFN α , пг/мл IFN α , pg/ml	14,82 12,77–17,14	14,28 12,86–15,36	13,9 13,6–17,3	14,28 13,57–15,71
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/ml	9,3 6,33–12,04	9,58 7,11–10,77	6,76 5,8–63,4	7,74 6,75–9,61

Примечание. p* — сравнение групп с эндометриозом и генитальной инфекцией с контрольной группой; p** — сравнение между группами с эндометриозом без генитальной инфекции и с генитальной инфекцией.

Note. p* — comparison of groups with endometriosis and genital infection with the control group; p** — comparison between groups with endometriosis without genital infection and with genital infection.

Таблица 4. Показатели функциональной активности нейтрофилов перитонеальной жидкости пациенток с 3–4 стадиями перитонеального эндометриоза

Table 4. Indicators of the functional activity of neutrophils in the peritoneal fluid of patients with 3–4 stages of peritoneal endometriosis

Показатели перитонеальной жидкости Indicators of peritoneal fluid	1а группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза, возбудители генитальной инфекции не выделены 1 group Patients with 1–2 stages of endometriosis, genital pathogens are not isolated n = 22	2а группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза и HPV ВКР 2 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and HPV n = 17	3а группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma</i> spp. 3 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma</i> spp. n = 18	4 группа Контрольная группа здоровых женщин 4 group Control group of healthy women n = 14
	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /л	5,8 3,7–7,53	6,48 4,2–10,1	4,8 2,6–10,4	6,65 3,15–15,15
Жизнеспособность, % Viability, %	90* 81,25–95,25 p _{1/4} < 0,01	92* 83–97 p _{2/4} < 0,01	93* 82–98 p _{3/4} = 0,03	98* 95–99,25 p _{1/4} < 0,01 p _{2/4} < 0,01 p _{3/4} = 0,03
Жизнеспособность, 10 ⁹ /л Vitality, 10 ⁹ /л	5,25 3,08–7,057	4,9 23,6–9,9	4,5 2,4–9,6	6,5 3,05–15
Лизосомальная активность нейтрофилов, у.е. Lysosomal activity of neutrophils, RU	129 87–203	114 96–225,5	184 104–244	212 97,5–262
НСТ-тест нейтрофилов спонтанный, % NBT-test neutrophil spontaneous, %	12 8,5–19	16 10–20	18 9–25,5	10 8–19,5
НСТ-тест нейтрофилов спонтанный, у.е. NBT-test neutrophil spontaneous, RU	0,14 0,1–0,25	0,2 0,12–0,26	0,23 0,095–0,35	0,15 0,85–0,225
НСТ-тест нейтрофилов индуцированный, % NBT-test neutrophil induced, %	28 18–33	28 18–40	30 14–38	20,5 14–24
НСТ-тест нейтрофилов индуцированный, у.е. NBT-test neutrophil induced, RU	0,32 0,22–0,5	0,34 0,2–0,54	0,41 0,15–0,56	0,23 0,185–0,335
Фагоцитарная активность нейтрофилов, % Phagocytic activity of neutrophils, %	44 40,5–58	44 42–48	42,5 34,8–48,5	42 33,75–45,0
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, у.е. The intensity of phagocytosis of neutrophils, RU	1,41 1,06–1,59	1,39 1,3–1,62	1,4 0,9–1,8	1,19 0,99–1,43

Показатели перитонеальной жидкости Indicators of peritoneal fluid	1а группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза, возбудители генитальной инфекции не выделены 1 group Patients with 1–2 stages of endometriosis, genital pathogens are not isolated n = 22	2а группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза и HPV ВКР 2 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and HPV n = 17	3а группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma</i> spp. 3 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma</i> spp. n = 18	4 группа Контрольная группа здоровых женщин 4 group Control group of healthy women n = 14
	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅
Фагоцитарное число нейтрофилов, у.е. Phagocytic number of neutrophils, RU	3,2 2,8–3,25	3,2 2,9–3,3	3,1 2,6–3,8	2,95 2,625–3,15
Лизосомальная активность макрофагов, у.е. Lysosomal activity of macrophages, RU	145 89–196	98 73,5–153	177 92,8–232,3	197 131–215
НСТ-тест макрофагов спонтанный, % NBT-test macrophage spontaneous, %	14 8–30,5	24 16–32	24 10–34	15,5 8,5–21,5
НСТ-тест макрофагов спонтанный, у.е. NBT-test macrophage spontaneous, RU	0,185 0,1–0,335	0,3 0,18–0,41	0,3 0,08–0,38	0,17 0,09–0,275
НСТ-тест макрофагов индуцированный, % NBT-test macrophage induced, %	25 21,5–40,25	38 26,5–51	36 13,5–53,5	25 18,25–36,5
НСТ-тест макрофагов индуцированный, у.е. NBT-test macrophages induced, RU	0,35 0,24–0,53	0,52* 0,32–0,66 p _{2/4} = 0,04	0,48 0,16–0,7	0,29* 0,23–0,465 p _{2/4} = 0,04
Фагоцитарная активность макрофагов, % Phagocytic activity of macrophages, %	50 41,25–52	46 39,5–49,5	44 38–52,1	50 44,25–52
Интенсивность фагоцитоза макрофагов, у.е. Macrophage phagocytosis intensity, RU	1,74 1,12–2,04	1,56 1,11–2,02	1,48 0,99–2,1	1,57 1,42–1,8
Фагоцитарное число макрофагов, у.е. Phagocytic number of macrophages, RU	3,3 2,7–3,93	3,2 2,72–3,9	3,1 2,75–4,1	3,2 2,83–3,65

Примечание. p* — сравнение групп с эндометриозом и генитальной инфекцией с контрольной группой; p** — сравнение между группами с эндометриозом без генитальной инфекции и с генитальной инфекцией; у.е. — условные единицы.

Note. p* — comparison of groups with endometriosis and genital infection with the control group; p** — comparison between groups with endometriosis without genital infection and with genital infection; RU — relative units.

n = 29) и интенсивности ($r_s = -0,620$, $p < 0,001$, n = 29) макрофагов перитонеальной жидкости; IL-2 ($r_s = -0,679$, $p = 0,001$, n = 19) и IL-4 ($r_s = -0,532$, $p = 0,016$, n = 20). Также выявлена обратная корреляция между наличием *Ureaplasma* spp. и НСТ спонтанной ($r_s = -0,458$, $p = 0,018$, n =

26) активности нейтрофилов, НСТ спонтанной активности ($r_s = -0,406$, $p = 0,026$, n = 30) и интенсивности ($r_s = -0,418$, $p = 0,022$, n = 30) макрофагов перитонеальной жидкости.

Для проведения анализа иммунологических показателей среди пациенток с 3–4 стадиями

Таблица 5. Уровни цитокинов перитонеальной жидкости у пациенток с 3–4 стадиями наружного генитального эндометриоза

Table 5. Cytokine levels of peritoneal fluid in patients with 3–4 stages of endometriosis

Показатели перитонеальной жидкости Indicators of peritoneal fluid	1 группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза, возбудители генитальной инфекции не выделены 1 group Patients with 1–2 stages of endometriosis, genital pathogens are not isolated n = 16	2 группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза и HPV ВКР 2 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and HPV n = 15	3 группа Пациентки с 3–4 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma</i> spp. 3 group Patients with 1–2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma</i> spp. n = 15	4 группа Контрольная группа здоровых женщин 4 group Control group of healthy women n = 14
	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅	Me Q ₂₅ – Q ₇₅
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	10,81 8–12,15	11,61 10,67–12,28	11,48 10,7–12,01	11,21 10,40–11,48
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	3,14* ** 3,04–3,18 $p_{1/4} < 0,01$ $p_{1/2} = 0,02$ $p_{1/3} < 0,01$	3,27** 3,05–3,65 $p_{1/2} = 0,02$	3,37** 3,1–3,5 $p_{1/3} < 0,01$	3,43* 3,18–5,04 $p_{1/4} < 0,01$
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	93,65 ** 74,8–122,78 $p_{1/2} = 0,01$ $p_{1/3} = 0,03$	129,65* ** 91,94–293,34 $p_{2/4} < 0,01$ $p_{1/2} = 0,01$	129,6* ** 73,2–874,2 $p_{1/3} = 0,03$ $p_{3/4} < 0,01$	51,368* 13,62–118,24 $p_{2/4} < 0,01$ $p_{3/4} < 0,01$
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	9,75** 3,08–12,88 $p_{1/3} = 0,04$	6 3,57–84,13	36,2* ** 4,9–172,7 $p_{1/3} = 0,04$ $p_{3/4} = 0,04$	3,57* 3,13–89,01 $p_{3/4} = 0,04$
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	29,16** 18,5–36,1 $p_{1/2} = 0,03$	35,97** 25,84–80,1 $p_{1/2} = 0,03$	27,01 19,3–93,6	21,94 15,81–62,46
IL-12, пг/мл IL-12, pg/ml	2,6** 2,39–3,07 $p_{1/3} = 0,02$	2,7 2,6–3,28	3,18* ** 2,5–3,2 $p_{1/3} = 0,02$ $p_{3/4} < 0,01$	2,79* 2,39–3,02 $p_{3/4} < 0,01$
TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	3,28** 2,94–3,43 $p_{1/2} = 0,04$	3,94** 3,1–4,5 $p_{1/2} = 0,04$	24,9* 2,9–108,8 $p_{3/4} = 0,01$	3,1* 2,28–12,74 $p_{3/4} = 0,01$
IFN α , пг/мл IFN α , pg/ml	15,36** 13,48–15,98 $p_{1/3} < 0,01$	15,71 14,28–17,14	15,4** 13,9–17,14 $p_{1/3} < 0,01$	14,28 13,57–15,71
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/ml	8,31** 7,32–8,62 $p_{1/2} = 0,04$	9,42* ** 8,17–11,41 $p_{2/4} = 0,04$ $p_{1/2} = 0,04$	10,14 7,04–11,4	7,74* 6,75–9,61 $p_{2/4} = 0,04$

Примечание. p* — сравнение групп с эндометриозом и генитальной инфекцией с контрольной группой; p** — сравнение между группами с эндометриозом без генитальной инфекции и с генитальной инфекцией.

Note. p* — comparison of groups with endometriosis and genital infection with the control group; p** — comparison between groups with endometriosis without genital infection and with genital infection.

НГЭ было выделено 3 группы: 1а группа — пациентки с НГЭ, у которых не выделены возбудители генитальной инфекции ($n = 22$); 2а группа — пациентки с НГЭ и HPV ВКР ($n = 17$); 3а группа — пациентки с НГЭ и *Ureaplasma* spp. ($n = 18$); контрольную группу составили здоровые женщины репродуктивного возраста — 4 группа ($n = 14$).

Состояние врожденного иммунитета перитонеальной жидкости у пациенток с 3–4 стадиями НГЭ представлено в таблице 4.

У женщин 1а группы, при сравнении с показателями контрольной группы, было снижено относительное количество жизнеспособных лейкоцитов перитонеальной жидкости ($p < 0,01$). Такие же изменения наблюдались у пациенток с HPV ВКР ($p < 0,01$) и *Ureaplasma* spp. ($p = 0,03$). При наличии HPV ВКР установлено повышение НСТ индуцированной интенсивности макрофагов ($p = 0,04$).

У женщин с 3–4 стадиями НГЭ и *Ureaplasma* spp., в сравнении с контролем, изменений не выявлено.

При межгрупповом сравнении среди женщин с 3–4 стадиями НГЭ достоверных отличий не выявлено.

Результаты исследования уровня цитокинов перитонеальной жидкости у женщин с 3–4 стадиями НГЭ представлены в таблице 5.

У пациенток 1а группы, при сравнении с группой контроля, отмечено снижение IL-4 ($p < 0,01$).

При наличии HPV ВКР установлено повышение IL-6 ($p < 0,01$), IFN γ ($p = 0,04$) в сравнении с контрольной группой.

При *Ureaplasma* spp. по сравнению с контролем были повышены IL-6 ($p < 0,01$), IL-8 ($p = 0,04$), IL-12 ($p < 0,01$) и TNF α ($p = 0,01$).

Сравнительный анализ среди женщин с 3–4 стадиями НГЭ показал при HPV ВКР повышение IL-4 ($p = 0,02$), IL-6 ($p = 0,01$), IL-10 ($p = 0,03$), TNF α ($p = 0,04$) и IFN γ ($p = 0,04$) в сравнении с 1а группой. При *Ureaplasma* spp. — повышение IL-4 ($p < 0,01$), IL-6 ($p = 0,03$), IL-8 ($p = 0,04$), IL-12 ($p = 0,02$) и IFN α ($p < 0,01$) в сравнении с 1а группой.

По данным корреляционного анализа у женщин с 3–4 стадиями НГЭ, выявлено наличие прямой корреляции между присутствием HPV ВКР и количеством IL-4 ($r_s = 0,415$, $p = 0,02$, $n = 31$), IL-6 ($r_s = 0,462$, $p = 0,009$, $n = 31$), IL-10 ($r_s = 0,404$, $p = 0,024$, $n = 31$), IFN γ ($r_s = 0,376$, $p = 0,037$, $n = 31$), TNF α ($r_s = 0,379$, $p = 0,035$, $n = 31$) в перитонеальной жидкости. Также выявлена прямая корреляция между наличием *Ureaplasma* spp. и количеством IL-4 ($r_s = 0,508$, $p = 0,003$, $n = 32$), IL-6 ($r_s = 0,404$, $p = 0,024$, $n = 31$), IL-8 ($r_s = 0,361$, $p = 0,046$, $n = 31$), IL-12 ($r_s = 0,440$, $p = 0,019$, $n = 28$), TNF α ($r_s = 0,495$, $p = 0,005$, $n = 31$) в перитонеуме.

Обсуждение

По данным литературы, объем перитонеальной жидкости при генитальном эндометриозе увеличивается [5]. В нашем исследовании объем перитонеальной жидкости у женщин с 1–2 и 3–4 стадиями НГЭ статистически значимо не отличался и составил от 10 до 30 мл. В перитонеальной жидкости женщин с НГЭ, независимо от стадии и наличия возбудителей генитальной инфекции, установлено снижение относительного количества жизнеспособных лейкоцитов.

Ранее проведенными исследованиями было показано повышение функциональной активности перитонеальных нейтрофилов и макрофагов при НГЭ, связанное с активным синтезом простагландинов, металлопротеиназ, цитокинов и хемокинов [13]. В нашем исследовании повышение НСТ индуцированной активности перитонеальных макрофагов наблюдалось у женщин с 1–2 стадиями НГЭ только при отсутствии возбудителей генитальной инфекции. Наличие HPV ВКР и *Ureaplasma* spp. характеризовалось снижением НСТ спонтанной и индуцированной активности перитонеальных нейтрофилов и макрофагов. Однако, при 3–4 стадиях наблюдалось повышение функциональной активности перитонеальных нейтрофилов и макрофагов в группах с генитальной инфекцией. Кроме этого, у женщин с 3–4 стадиями НГЭ и *Ureaplasma* spp. в сравнении с контролем НСТ спонтанная [$p = 0,049$ (%)] и индуцированная [$p = 0,035$ (у.е.)] активность перитонеальных нейтрофилов и спонтанная активность [$p = 0,006$ (%), $p = 0,023$ (у.е.)] макрофагов была выше, чем при 1–2 стадиях.

В перитонеальной жидкости больных эндометриозом увеличена концентрация цитокинов (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α) [9, 12, 16, 19]. По данным нашего исследования, при 1–2 стадиях НГЭ в группе, где отсутствовали возбудители генитальной инфекции, изменения уровня цитокинов не установлено. При распространенном эндометриозе был снижен IL-4 и IL-2.

Особенностью у пациенток с 1–2 стадиями НГЭ и HPV ВКР было повышение IL-6, IL-8, TNF α при сравнении с контрольной группой. Эти цитокины продуцируются Th1- и Th2-лимфоцитами и характеризуют наличие активного воспаления. Однако при сравнении с результатами в группе без инфекции при HPV ВКР наблюдалось угнетение клеточного и гуморального иммунитета, которое выражалось в снижении IL-2 и IL-4. Таким образом, уже на ранних стадиях НГЭ при наличии HPV ВКР установлено повышение маркеров воспаления и адгезии в перитонеуме, а также угнетение реакций клеточного иммунитета. При 3–4 стадиях НГЭ и HPV ВКР сохранялся повы-

шенный уровень ИЛ-6, TNF α , как при 1–2 стадиях. Кроме этого, повышались противовоспалительные ИЛ-4, ИЛ-10, а также IFN γ , который не только ограничивает распространение вирусов, но и стимулирует активность макрофагов и натуральных киллеров.

На фоне *Ureaplasma* spp. при 1–2 стадиях установлено повышение ИЛ-8, а при 3–4 стадиях — повышение ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, TNF α .

Соколов Д.И. и соавт. установили повышение ИЛ-4 в перитонеальной жидкости, которое коррелирует со степенью тяжести НГЭ [6]. По данным проведенного исследования ИЛ-4 повышался при распространенном эндометриозе только у женщин с генитальной инфекцией.

Медиатор хронического воспалительного процесса ИЛ-6 повышается в перитонеальной жидкости преимущественно у пациенток с 3–4 стадиями НГЭ и положительно связан с дисменореей и тазовой болью [3, 6, 10, 29]. По данным нашего исследования, ИЛ-6 был повышен уже при 1–2 стадиях НГЭ в группе женщин с HPV ВКР.

Концентрация ИЛ-8, индуцирующего апоптоз цитотоксических Т-лимфоцитов и способного усиливать ангиогенез и перитонеальную адгезию клеток эндометрия, по данным некоторых авторов повышена в перитонеальной жидкости женщин с НГЭ, особенно в начальных стадиях заболевания [11, 17, 28]. В нашем исследовании повышение ИЛ-8 в перитонеальной жидкости на ранних и поздних стадиях наблюдалось у женщин с *Ureaplasma* spp. и на ранних стадиях — при HPV ВКР. Suen J.L. и соавт. (2013) установили повышение сывороточного и перитонеального ИЛ-10 при НГЭ, при этом, наиболее высокая концентрация ИЛ-10 в перитонеальной жидкости выявлена у пациенток с эндометриоидными кистами яичников [27]. ИЛ-10 подавляет иммунный ответ против эндометриоидных имплантов, способствуя развитию эндометриоза [24, 27]. Полученные в нашем исследовании данные показали увеличение ИЛ-10 при 3–4 стадиях у женщин с HPV ВКР.

Большое значение имеет повышение TNF α при НГЭ, который усиливает адгезию стромальных клеток эндометриоидных гетеротопий на мезотелии, активизирует лейкоциты и макрофаги стимулирует синтез ИЛ-1, ИЛ-6 [10]. Уровень TNF α позитивно коррелирует с интенсивностью боли при эндометриозе [24, 26]. В нашем исследовании TNF α был повышен у женщин с HPV ВКР как при 1–2, так и при 3–4 стадиях НГЭ.

У женщин 1а группы уровень ИЛ-2 ($p = 0,036$), ИЛ-4 ($p < 0,001$), ИЛ-10 ($p = 0,002$) был ниже, чем у пациенток 1 группы, а в 3а группе количество ИЛ-4 ($p = 0,004$), ИЛ-6 ($p = 0,027$), ИЛ-12 ($p = 0,022$), TNF α было больше ($p = 0,006$), а ИЛ-8 — меньше ($p = 0,049$), чем в 3 группе.

При наличии HPV ВКР и *Ureaplasma* spp. у женщин с 1–2 стадиями НГЭ снижалась функциональная активность перитонеальных нейтрофилов и макрофагов. Кроме этого, наличие HPV ВКР коррелировало со снижением ИЛ-2, ИЛ-4. При 3–4 стадиях НГЭ по данным корреляционного анализа наличие HPV ВКР и *Ureaplasma* spp. характеризовалось повышением как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в перитонеуме, однако более высокая активность Th2 клеток в перитонеальной жидкости, секретирующих ИЛ-4 и ИЛ-10 и подавляющих клеточный иммунитет, наблюдалась при HPV ВКР.

Заключение

Результаты исследования показали наиболее выраженные изменения иммунологических показателей перитонеальной жидкости при наличии возбудителей генитальной инфекции и, особенно, — HPV ВКР. Формирующиеся на фоне бактериальных и вирусных возбудителей иммунные нарушения могут способствовать имплантации эндометриальных клеток на органах малого таза и прогрессированию заболевания.

Список литературы/References

1. Ашрафян Л.А., Бабаева Н.А., Антонова И.Б., Ивашин С.В., Моцкобили Т.А., Алешикова О.И., Кузнецов И.Н. Папилломавирусная инфекция и нарушение баланса эстрогеновых метаболитов как фактор риска развития рака органов женской репродуктивной системы // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2015. Т. 4, № 1. С. 5–12. [Ashrafyan L.A., Babaeva N.A., Antonova I.B., Ivashin S.V., Motzkobili T.A., Aleshikova O.I., Kuznetsov I.N. Human papillomavirus infection and imbalance of estrogen metabolites as a risk factor for the development of cancer of the female reproductive system. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gercena = Oncology. P.A. Herzen Journal*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 5–12. doi: 10.17116/onkolog2015415-12 (In Russ.)]
2. Бахтияров К.Р., Щукина А.С. Вирус папилломы человека — современный взгляд на проблему // Здоровье и образование в XXI веке. 2017. Т. 19, № 2. С. 37–42. [Bakhtiyarov K.R., Shchukina A.S. Human papillomavirus — a modern view of the problem. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and Education. Millennium*, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 37–42. doi: 10.26787/nydha-2226-7425-2017-19-12-37-42 (In Russ.)]
3. Глякин Д.С., Самойлова А.В., Гунин А.Г. Провоспалительные цитокины у больных раком эндометрия // Проблемы репродукции. 2012. Т. 18, № 1. С. 35–37. [Gliakin D.S., Samoilova A.V., Gunin A.G. Proinflammatory cytokines in patients with endometrial cancer. *Problemy reprodukcii = Reproduction Problems*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 35–37. (In Russ.)]

4. Савченко А.А., Цхай В.Б., Круглова Д.Ю., Борисов А.Г. Иммунологические показатели при моноинфекции вирусом папилломы человека и сочетанной папилломавирусной и урогенитальной инфекции // *Инфекция и иммунитет*. 2014. Т. 4, № 3. С. 241–248. [Savchenko A.A., Tshai V.B., Kruglova K.Y., Borisov A.G. Immunological parameters in patients with mono-infection by human papillomavirus and in patients co-infected by papillomavirus and urogenital pathogens. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 3, pp. 241–248. doi: 10.15789/2220-7619-2014-3-241-248 (In Russ.)]
5. Слесарева К.В., Ермолова Н.В., Линде В.А., Колесникова Л.В., Томай Л.Р. К вопросу о патогенезе наружного генитального эндометриоза // *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2013. № 1. С. 18–22. [Slesareva K.V., Ermolova N.V., Linde V.A., Kolesnikova L.V., Tomay L.R. To the question of the pathogenesis of external genital endometriosis. *Zhurnal fundamental'noj mediciny i biologii = Journal of Fundamental Medicine and Biology*, 2013, no. 1, pp. 18–22. (In Russ.)]
6. Соколов Д.И., Кондратьева П.Г., Ярмолинская М.И., Крамарева Н.Л., Селютин А.В., Рулев В.В., Ниаури Д.А., Сельков С.А. Содержание хемокинов и цитокинов в перитонеальной жидкости больных наружным генитальным эндометриозом различной степени тяжести // *Медицинская иммунология*. 2007. Т. 9, № 1. С. 85–90. [Sokolov D.I., Kondratjeva P.G., Jarmolinskaja M.I., Kramareva N.L., Seljutin A.V., Rulev V.V., Niauri D.A., Selkov S.A. Contents of chemokines and cytokines in peritoneal fluid from the patients with endometriosis of various severity. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, vol. 9, no. 1, pp. 85–90. doi: 10.15789/1563-0625-2007-1-85-90 (In Russ.)]
7. Тихомиров А.Л., Манухин И.Б., Батаева А.Е. Новая концепция возможного патогенеза эндометриоза. Обоснование профилактики // *Русский медицинский журнал*. 2012. Т. 20, № 1. С. 6–10. [Tikhomirov A.L., Manukhin I.B., Bataeva A.E. A new concept of the possible pathogenesis of endometriosis. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2012, vol. 20, no. 1, pp. 6–10. (In Russ.)]
8. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных. М., 2016. 66 с. [Endometriosis: diagnosis, treatment and rehabilitation. Federal clinical guidelines for the management of patients. Moscow, 2016. 66 p. (In Russ.)]
9. Ярмолинская М.И. Цитокиновый профиль перитонеальной жидкости и периферической крови больных с наружным генитальным эндометриозом // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2008. № 3. С. 30–34. [Yarmolinskaya M.I. cytokine profile of peritoneal fluid and peripheral blood in patients with pelvic endometriosis. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2008, no. 3, pp. 30–34. (In Russ.)]
10. Ярмолинская М.И., Сельков С.А. Иммунокорректирующая терапия наружного генитального эндометриоза: методическое пособие для врачей. СПб.: Тактик-Студио, 2007. 35 с. [Yarmolinskaya M.I., Selkov S.A. Immunocorrecting therapy of external genital endometriosis: Handbook for doctors. St. Petersburg: Taktik-Studio, 2007. 35 p. (In Russ.)]
11. Ярмолинская М.И., Сельков С.А., Мануйлова Т.Ю., Беженарь В.Ф., Рулев В.В., Селютин А.В., Тхазаплизева С.Ш. Эффективность применения протеолитического препарата «Лонгидаза» в комбинированном лечении спаечного процесса у больных наружным генитальным эндометриозом // *Иммунология*. 2015. Т. 36, № 2. С. 116–121. [Yarmolinskaya M.I., Selkov S.A., Manuylova T.Yu., Bezhenar' V.F., Rulev V.V., Selyutin A.V., Tkhasaplizheva S.Sh. The efficacy of the proteolytic medication longidaza in combined treatment of adhesions in patients with genital endometriosis. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 36, no. 2, pp. 116–121. (In Russ.)]
12. Barcz E., Milewski Ł., Dziunycz P., Kamiński P., Płoski R., Malejczyk J. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. *Fertil. Steril.*, 2012, vol. 97, no. 6, pp. 1380–1386.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.057
13. Bulun S.E. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.*, 2009, vol. 360, no. 3, pp. 268–279. doi: 10.1056/NEJMra0804690
14. Campos G.B., Marques L.M., Rezende I.S., Barbosa M.S., Abrão M.S., Timenetsky J. Mycoplasma genitalium can modulate the local immune response in patients with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 2018, vol. 109, no. 3, pp. 549–560. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.11.009
15. Heidarpour M., Derakhshan M., Derakhshan-Horeh M., Kheirollahi M., Dashti S. Prevalence of high-risk human papilloma-virus infection in women with ovarian endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2017, vol. 43, no. 1, pp. 135–139. doi: 10.1111/jog.13188
16. Hou Z., Sun L., Gao L., Liao L., Mao Y., Liu J. Cytokine array analysis of peritoneal fluid between women with endometriosis of different stages and those without endometriosis. *Biomarkers*, 2009, vol. 14, no. 8, pp. 604–618. doi: 10.3109/13547500903183970
17. Kalu E., Sumar N., Giannopoulos T., Patel P., Croucher C., Sherriff E., Bansal A. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol. Research.*, 2007, vol. 33, no. 4, pp. 490–495. doi: 10.1111/j.1447-0756.2007.00569.x
18. Kobayashi H., Higashiura Y., Shigetomi H., Kajihara H. Pathogenesis of endometriosis: The role of initial infection and subsequent sterile inflammation (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 9–15. doi: 10.3892/mmr.2013.1755
19. Li J.X., Dai S.Z., Liu H., Cao Y.M., Liu S.Q. Study on the changes of T-lymphocyte subsets in the patients with endometriosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.*, 2005, vol. 40, no. 1, pp. 17–20.
20. Lousse J.C., Van Langendonck A., Defrere S., Ramos R.G., Colette S., Donnez J. Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease. *Front Biosci. (Elite Ed.)*, 2012, vol. 4, pp. 23–40. doi: 10.2741/e358
21. Lucidi R.S., Witz C.A., Chrisco M., Binkley P.A., Shain S.A., Schenken R.S. A novel in vitro model of the early endometriosis lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. *Fertil. Steril.*, 2005, vol. 84, pp. 16–21. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.10.058
22. Matarese G., De Placido G., Nicas Y., Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease. *Trends Mol. Med.*, 2003, vol. 9, no. 5, pp. 223–228. doi: 10.1016/S1471-4914(03)00051-0
23. Oppelt P., Renner S.P., Strick R., Valletta D., Mehlhorn G., Fasching P.A., Beckmann M.W., Strissel P.L. Correlation of high-risk human papilloma viruses but not of herpes viruses or Chlamydia trachomatis with endometriosis lesions. *Fertil. Steril.*, 2010, vol. 93, no. 6, pp. 1778–1786. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.061

24. Podgaec S., Dias Junior J.A., Chapron C., Oliveira R.M., Baracat E.C., Abrão M.S. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2010, vol. 56, no. 1, pp. 92–98. doi: 10.1590/s0104-42302010000100022
25. Sampson J.A. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. *Arch Surg.*, 1921, vol. 3, no. 2, pp. 245–323. doi: 10.1001/archsurg.1921.01110080003001
26. Scholl B., Bersinger N.A., Kuhn A., Mueller M.D. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. *Gynecol., Endocrinol.*, 2009, vol. 25, no. 11, pp. 701–706. doi: 10.3109/09513590903159680
27. Suen J.L., Chang Y., Chiu P.R., Hsieh T.H., Hsi E., Chen Y.C., Chen Y.F., Tsai E.M. Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model. *Am. J. Pathol.*, 2014, vol. 184, no. 2, pp. 464–471. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.10.023
28. Ulukus M., Ulukus E.C., Goker E.N.T., Tavmergen E., Zheng W., Arici A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein 1 in women with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 2009, vol. 91, no. 3, pp. 687–693. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.12.067
29. Velasco I., Acién P., Campos A., Acién M.I., Ruiz-Maciá E. Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, vol. 84, no. 2, pp. 199–205. doi: 10.1016/j.jri.2009.11.004
30. Vestergaard A.L., Knudsen U.B., Munk T., Rosbach H., Bialasiewicz S., Sloots T.P., Martensen P.M., Antonsson A. Low prevalence of DNA viruses in the human endometrium and endometriosis. *Arch. Virol.*, 2010, vol. 155, no. 5, pp. 695–703. doi: 10.1007/s00705-010-0643-y

Авторы:

Зайнетдинова Л.Ф., д.м.н., доцент, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия;

Телешева Л.Ф., д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия;

Коряушкина А.В., врач акушер-гинеколог клиники ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия.

Authors:

Zaynetdinova L.F., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Chelyabinsk, Russian Federation;

Telesheva L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Laboratory Diagnostics, Chelyabinsk, Russian Federation;

Koryaushkina A.V., Obstetrician-Gynecologist, Clinic of the South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.05.2019
Отправлена на доработку 12.09.2019
Принята к печати 22.10.2019

Received 05.05.2019
Revision received 12.09.2019
Accepted 22.10.2019

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ЛИХОРАДКИ КЕМЕРОВО В ТАЕЖНЫХ КЛЕЩАХ, СОБРАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ

М.Ю. Карташов^{1,2}, Т.П. Микрюкова¹, Е.И. Кривошеина^{1,2}, А.И. Кузнецов^{1,2},
Л.И. Глушкова³, И.В. Корабельников⁴, Ю.И. Егорова⁴, В.А. Терновой¹, В.Б. Локтев^{1,2,5}

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

³ Управление Роспотребнадзора по Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия

⁴ ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора, г. Сыктывкар, Россия

⁵ ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В последние годы регистрируется резкий рост случаев укусов иксодовыми клещами в северных регионах Европейской части России. В Республике Коми также резко увеличилось число лиц, обратившихся за медицинской помощью в связи с укусом клеща. Одновременно наблюдается рост заболеваемости клещевым энцефалитом, который особенно усилился с 2009 г. Информация о генетическом разнообразии возбудителей вирусных клещевых инфекций в этом регионе крайне ограничена. С целью идентификации и генотипирования возбудителей вирусных клещевых инфекций проведено исследование клещей *I. persulcatus*, собранных с растительности в южных и центральных районах Республики Коми. Методом ПЦР был выявлен генетический материал вирусов клещевого энцефалита и Кемерово в индивидуальных клещах. Секвенирование фрагментов генома этих вирусов позволило однозначно их идентифицировать. Генетический материал вируса клещевого энцефалита был выявлен в $6,8 \pm 1,2\%$ случаев. Генотипирование выявленных изолятов, проведенное на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена белка E вируса клещевого энцефалита, позволило установить, что 35% изолятов относятся к дальневосточному генотипу, а 65% — к сибирскому генотипу вируса клещевого энцефалита. Филогенетический анализ секвенированных последовательностей показал наличие не менее четырех геновариантов сибирского и дальневосточного генотипов вируса клещевого энцефалита, близких к вариантам этого вируса, циркулирующим на Урале и в Сибири. Уровень инфицированности таежного клеща вирусом Кемерово составил $0,8 \pm 0,2\%$. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса Кемерово позволило установить, что обнаруженный генетический материал вируса Кемерово имеет уровень гомологии приблизительно 94% при сравнении с другими известными последовательностями этого орбивируса. Филогенетический анализ фрагментов генома вируса Кемерово показал наличие не менее двух геновариантов этого вируса, циркулирующих в Республике Коми. Высказано предположение, что вирус клещевого энцефалита был относительно недавно интродуцирован в природные очаги Республики Коми из Уральского и Сибирского регионов. Генетические отличия вируса Кемерово предполагают более длительную эволюцию в исследованных природных очагах этого региона. Обсуждается возможная роль птиц и клещей, паразитирующих на них, в быстром рас-

Адрес для переписки:

Карташов Михаил Юрьевич
630559, Россия, Новосибирская область, п.г.т. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 923 419-31-92 (моб.). Факс: 8 (383) 336-74-09.
E-mail: mikkartash@yandex.ru

Contacts:

Mikhail Yu. Kartashov
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 923 419-31-92 (mobile). Fax: +7 (383) 336-74-09.
E-mail: mikkartash@yandex.ru

Библиографическое описание:

Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Терновой В.А., Локтев В.Б. Генотипирование возбудителей клещевого энцефалита и лихорадки Кемерово в таежных клещах, собранных в Республике Коми // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 159–166. doi: 10.15789/2220-7619-GOT-1147

Citation:

Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Yu.I., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Genotyping of tick-borne encephalitis and Kemerovo viruses in taiga ticks collected in the Komi Republic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 159–166. doi: 10.15789/2220-7619-GOT-1147

пространении вирусных клещевых инфекций в Республике Коми. Данные по генетическому разнообразию выявленных возбудителей клещевого энцефалита и лихорадки Кемерово могут быть полезны для улучшения диагностики, профилактики и лечения этих инфекционных заболеваний в Республике Коми.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, вирус Кемерово, *Ixodes persulcatus*, Республика Коми, генотипирование, ПЦР-диагностика.

GENOTYPING OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND KEMEROVO VIRUSES IN TAIGA TICKS COLLECTED IN THE KOMI REPUBLIC

Kartashov M.Yu.^{a,b}, Mikryukova T.P.^a, Krivosheina E.I.^{a,b}, Kuznetsov A.I.^{a,b}, Glushkova L.I.^c, Korabel'nikov I.V.^d, Egorova Yu.I.^d, Ternovoi V.A.^a, Loktev V.B.^{a,b,e}

^a State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

^c Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protections and Human Well-Being, Department of the Komi Republic, Syktyvkar, Russian Federation

^d "Disinfection", Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protections and Human Well-Being, Syktyvkar, Russian Federation

^e Institute of Cytology and Genetics the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Over the last years, an increasing rate of ixodes tick bites has been registered in the northern regions of the European Russia. In addition, the number of subjects request medical assistance due to tick bites has been dramatically increased in the Komi Republic. In addition, incidence of tick-borne encephalitis was also increased particularly starting since 2009. However, highly limited data on pathogen genetic diversity related to viral tick-borne infections in this region are currently available. Taiga ticks (*Ixodes persulcatus*) collected from the Komi Republic southern and central part vegetation were examined to identify and genotype tick-borne viruses. Individual ticks were used to identify by RT-PCR viral RNA coupled to tick-borne encephalitis and Kemerovo viruses. Viral genome fragment sequencing allowed to unambiguously identify these viruses. It was found that viral RNA tick-borne encephalitis was detected in $6.8 \pm 1.2\%$ individual ticks. Moreover, tick-linked isolate genotyping based on analyzing E protein gene fragment nucleotide sequence derived from tick-borne encephalitis discovered that 35% and 65% isolates belonged to the Far Eastern and Siberian subtype, respectively. In addition, subsequent phylogenetic analysis demonstrated that at least four variants of the Siberian and Far Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus were detected, which were close to the viruses circulating in the Urals and Siberia. In contrast, prevalence of Kemerovo virus in taiga ticks was $0.8 \pm 0.2\%$. Sequencing of Kemerovo virus RNA-dependent RNA polymerase gene fragment showed around 94% homology with the remainder of the Kemerovo virus strains. Phylogenetic analysis of the Kemerovo virus genome fragments demonstrated at least two subtypes circulating in the Komi Republic. Thus, it was suggested that tick-borne encephalitis virus was introduced relatively recently from the Urals and Siberian region into the natural foci of the Komi Republic. Moreover, genetic differences found in Kemerovo virus strains presume for them a longer lasting evolution throughout the natural foci of this region. In addition, a potential role for birds and their ticks in rapid spreading of viral tick-borne infections in the Komi Republic is also discussed. Thus, the data on genetic diversity of the viral agents related to tick-borne encephalitis and Kemerovo fever may be useful for improving their diagnostics, prevention and treatment in the Komi Republic.

Key words: tick-borne encephalitis virus, Kemerovo virus, *Ixodes persulcatus*, Komi Republic, genotyping, PCR detection.

Введение

Изменение ареалов распространения иксодовых клещей и распространение ими различных возбудителей вирусных инфекций делают проблему клещевых вирусных инфекций актуальной для большинства европейских стран [9, 11]. В последние годы регистрируется резкий рост случаев укусов иксодовыми клещами в северных регионах Европы [1, 2, 17]. Отмечен рост заболеваемости клещевым энцефалитом (КЭ) и клещевым боррелиозом в Архангельской области и Республике Коми. Так, в период с 1992 по 2011 гг. в Республике Коми число лиц, обратившихся за медицинской помощью в связи с укусом клеща, возросло в 23 раза, а период активности клещей расширился с четырех месяцев до шести (с апреля по сентябрь) [18]. Заболеваемость КЭ на территории Коми непре-

рывно растет с 1970 г., причем наиболее значительный подъем заболеваемости наблюдается после 2009 г. Проведенное в 2010 г. генотипирование вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в таежных клещах выявило преимущественную циркуляцию дальневосточного генотипа ВКЭ [14]. Это позволило считать, что КЭ стал новой клещевой вирусной инфекцией для северных районов европейской части России.

Другим вирусным агентом, ассоциированным с иксодовыми клещами, является представитель рода *Orbivirus* — вирус Кемерово (КЕМВ). Ранее, КЕМВ был выделен из иксодовых клещей на различных территориях средней полосы России в Сибири (Кемеровская, Новосибирская, Омская, Иркутская области, Республика Алтай), на Урале (Свердловская, Курганская области, Республика Удмуртия), а также в европейской части России (Московская, Костромская, Вологодская облас-

ти) [4, 6, 16]. Вирус Кемерово вызывает заболевание человека, характеризующееся резким повышением температуры, появлением сыпи и развитием неврологических расстройств. В тяжелых случаях возможно развитие миокардита и менингоэнцефалита. В настоящее время диагностика этого заболевания у человека затруднена отсутствием доступных диагностических средств, что маскирует данную вирусную клещевую инфекцию среди других вирусных и бактериальных инфекций человека. Факты циркуляции KEMV и случаи заболевания человека лихорадкой Кемерово в северных районах европейской части России ранее были не известны.

В данной работе методами генетической диагностики оценено наличие циркуляции ВКЭ и KEMV в таежных клещах на территории Республики Коми, а также приведена попытка оценить возможное генетическое разнообразие возбудителей этих вирусных клещевых инфекций, провести их генотипирование и выявить возможные эволюционные взаимосвязи этих вирусных агентов с циркулирующими в других регионах ВКЭ и KEMV.

Материалы и методы

В исследование были взяты 380 клещей вида *I. persulcatus* (самки — 185 особей, самцы — 174, нимфы — 21), собранных в 2016 г. с растительности в южных и центральных районах Республики Коми, где наиболее часто регистрируются случаи присасывания клещей. Определение видовой принадлежности клещей осуществляли по морфологическим признакам с последующей верификацией путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента (660 п.н.) гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы в митохондриальном геноме клеща. Гомогенизацию клещей проводили на лабораторном гомогенизаторе TissueLyser

(Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение суммарных нуклеиновых кислот производили с использованием набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (Некстбио, Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью набора «Реверта-100» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Выявление генетических маркеров ВКЭ и KEMV проводили методом ПЦР с использованием ПЦР-смеси «БиоМастер HS-Тақ» (Биолабмикс, г. Новосибирск, Россия) и олигонуклеотидных праймеров, комплементарных исследуемым локусам (табл.).

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР, очищенных на микроколонках (Биосилика, г. Новосибирск, Россия), проводили с использованием набора BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программ Unipro UGENE v. 1.30 [15] и MEGA7 [12]. Построение филогенетических деревьев проводили методом максимального правдоподобия. Статистические индексы поддержки ветвей были получены с помощью bootstrap-анализа для 1000 итераций.

Установленные нуклеотидные последовательности зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами MK304517-MK304519 (для изолятов KEMV) и MK304520-MK304545 (для изолятов ВКЭ).

Результаты

Генетический материал ВКЭ был обнаружен в 26 из 380 исследованных клещей *I. persulcatus*. Таким образом, вирусофорность клещей составила $6,8 \pm 1,2\%$. Генотипирование выявленных изолятов ВКЭ было проведено путем определе-

Таблица. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для выявления генетического материала ВКЭ и KEMV

Table. Oligonucleotide primers used to detect genetic material of the TBEV and KEMV

Мишень Target	Название Abbreviation	Структура праймера (5'→3') Structure of primers	Размер ампликона (п.н.) Amplicon size (b.p.)	Температура отжига Temperature of reaction	Ссылка References
Ixodes spp. (gene COI)	IpCX-6f	ATTAGGAGCACCTGATATAGCTTTCCC	660	62	Данная работа This investigation
	IpCX-9r	GCTGTAATAAGCTCGAGTGTGCGATA			
KEMV (сегмент 1, ген полимеразы) KEMV (segment 1, RNA polymerase)	rt_Kem4f	TCCGCCACCCTGGAATGAGAC	116	60	[6]
	rt_Kem4r	TCAGGATCGGTCAAGGCCATTC			
	Kem_prb4	FAM-AGCCGTTTCTGTCCACGAGACG-BHQ1	170	58	Данная работа This investigation
	Kem_F64	TGAGCGGATAACAATTTACACAC			
Kem_R234	GTCATTACTGGATCTATCAACAGG				
ВКЭ TBEV (E-NS1)	E7	GGCATAGAAAGGCTGACAGTG	340	52	[16]
	E10	GATACCTCTCTCCACACAACCAG			
	E9	ACAGTGATAGGAGAACACGCTGGG	210	52	
	E8	CAGCCAGGAGGAAGCTCATGGAC			

ния нуклеотидной последовательности фрагмента гена E (210 п.н.). Девять изолятов (35%) были отнесены к дальневосточному генотипу, а 17 (65%) — к сибирскому генотипу ВКЭ. Генетический материал ВКЭ был обнаружен как у самок (69%), так и у самцов (31%), инфицированных нимф выявлено не было. Анализ филогенетических взаимоотношений изучаемых изолятов показал циркуляцию на территории Коми

различных генетических вариантов ВКЭ (рис. 1). Все исследованные образцы оказались оригинальными и не имели 100% гомологии с уже известными вирусными штаммами сибирских и дальневосточных генотипов ВКЭ.

Восемь изолятов ВКЭ дальневосточного типа кластеризовались с прототипными штаммами 205 (DQ989336), Novosibirsk-L2008 (KJ739729), Tomsk-PT12 (KM019546) и имели уровень го-

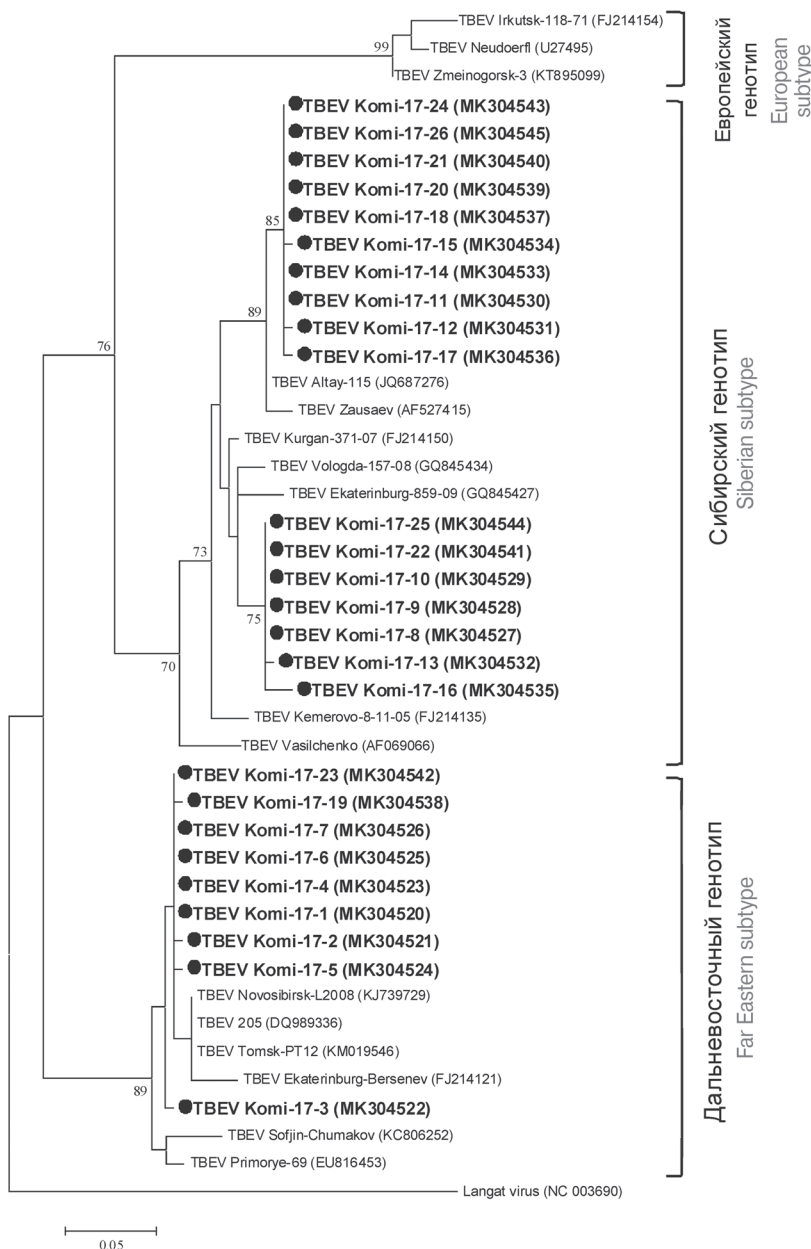


Рисунок 1. Филогендрограмма, отображающая генетическую близость исследуемых изолятов ВКЭ (●) и известных прототипных штаммов ВКЭ, представляющих три основных генотипа ВКЭ

Figure 1. Phylogenetic tree demonstrating genetic proximity in TBEV isolates (●) and the three main subtypes for TBEV prototype strains

Примечание. Филогенетическое дерево построено на основе фрагмента (210 п.н.) структурного гена E с использованием метода максимального правдоподобия, модель эволюции GTR+I+G, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов. В качестве внешней группы сравнения использовался вирус Лангат.

Note. Based on the structural E gene fragment (210 b.p.) by using the maximum likelihood estimation, GTR+I+G evolution model, support indices calculated per 1000 repetitions. Langat virus was used as an external comparison group.

мологии с ними 99,0%. Изолят Komi-17-3 формировал отдельную ветвь в пределах кластера дальневосточного генотипа и имел наибольший уровень гомологии с прототипным штаммом Tomsk-PT12, выделенным от садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) на территории Томской области (уровень гомологии 98,2%).

Изучаемые изоляты ВКЭ сибирского генотипа четко расхолились на две отдельные субклады в пределах сибирского генотипа. Десять изолятов входили в субкладу, сформированную прототипным штаммом Заусаев (AF527415). Семь выявленных изолятов образовывали отдельную субкладу и показывали наибольшую гомологию с вариантами ВКЭ, обнаруженными в Екатеринбурге (GQ845427) — 98,2%, Вологде — 97,5% (GQ845434) и в Кургане (FJ214150) — 97,2%.

При скрининге 380 образцов кДНК исследуемых клещей было выявлено 3 положительных пробы, содержащих генетический материал КЕМV. Таким образом, уровень инфицированности таежных клещей КЕМV составил $0,8 \pm 0,2\%$. Все клещи, в которых был выявлен КЕМV, являлись самками. Для выявленных изолятов КЕМV были определены нуклеотидные последовательности фрагмента сегмента 1 (255 п.н.), кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. На основании полученных данных было построено филогенетическое дерево (рис. 2) и проведено сравнение с известными последовательностями КЕМV и других близкородственных вирусов, депонированными в международной базе данных GenBank NCBI. Результаты филогенетического анализа подтвердили таксономическую принадлежность выявленных изолятов к КЕМV. Изоляты Komi-1 и Komi-2 идентичны между собой по данному участку генома и отличаются от изолята Komi-3 семью нуклеотидными заменами (уровень гомологии — 97,3%), которые приводят в конечном счете к 4 аминокислотными заменам. Выявленные изоляты КЕМV, циркулирующие на территории Республики Коми, формировали отдельную ветвь в пределах клады, сформированной прототипными штаммами КЕМV. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей этих же изолятов в Республике Коми, в сравнении с другими известными последовательностями КЕМV, составил приблизительно 94%.

Обсуждение

На территории северной Евразии ВКЭ представлен несколькими генотипами, каждый из которых при попадании в организм человека может вызывать заболевания разной степени тяжести. Обычно ВКЭ подразделяют на 3 основных генотипа — дальневосточный, сибирский и европейский [8]. Недавно было сформулировано предложение о выделении байкальского и гималайского генотипов ВКЭ [5]. В таежных кле-

щах, собранных с растительности в Республике Коми, к дальневосточному генотипу было отнесено 35%, а к сибирскому генотипу — 65% секвенированных последовательностей РНК из изолятов ВКЭ. Нам не удалось выявить у собранных таежных клещей генетический материал, свойственный европейскому, байкальскому и гималайскому генотипам ВКЭ.

Большая часть выявленных образцов сибирского генотипа ВКЭ может быть отнесена к геногруппе Заусаев-подобных штаммов. Данная группа ВКЭ интересна тем, что прототипный для этой группы штамм Заусаев был выделен из мозга погибшего в 1985 г. 34-летнего пациента с хроническим клещевым энцефалитом, который был атакован клещом в Томской области в 1973 г. [10]. Причем у пациента после укуса клеща не было зарегистрировано развития острого клещевого энцефалита. Развитие клинически выраженного энцефалита началось приблизительно через 10 лет после укуса клеща, что привело к гибели пациента спустя два года от хронического клещевого энцефалита. Гипотеза о способности штамма Заусаев вызывать хронические формы клещевого энцефалита, к сожалению, опирается на отрывочные и неполные данные. Это, по всей вероятности, связано с крайне длительным инкубационным периодом данного заболевания, что, видимо, не позволяет связать возможные поражения ЦНС у пациента с укусом клеща, который имел место многие годы назад.

Эпидемиологическая значимость распространения дальневосточного генотипа ВКЭ связана с его высокой патогенностью для человека по сравнению с другими генотипами ВКЭ. Дальневосточный генотип ВКЭ вызывает тяжелые вирусные энцефалиты и менингоэнцефалиты со смертностью до 30% [10]. Распространение дальневосточного генотипа ВКЭ, а также возможность появления хронических форм КЭ требует особого внимания к диагностике и профилактике данного заболевания в Республике Коми.

Проведенный филогенетический анализ показывает кластеризацию изолятов ВКЭ на 4 геногруппы. Две геногруппы сибирского генотипа взаимосвязаны с теми вариантами ВКЭ, которые циркулируют в Уральском регионе, на юге Западной Сибири и Алтае. Варианты дальневосточного генотипа близки к вариантам ВКЭ этого субтипа, циркулирующим на юге Западной Сибири. Формирование четырех геногрупп ВКЭ позволяет сделать предположение, что занос ВКЭ на территорию Республики Коми имел место не менее 4 раз, причем ВКЭ преимущественно распространялся с восточных регионов РФ, с районов Урала и Сибири, где циркулируют подобные штаммы ВКЭ. Интересно отметить, что аналогичные штаммы дальневосточного генотипа ВКЭ были ранее обнаружены у садовой камышовки в окрестностях г. Томска [14]. Арéal

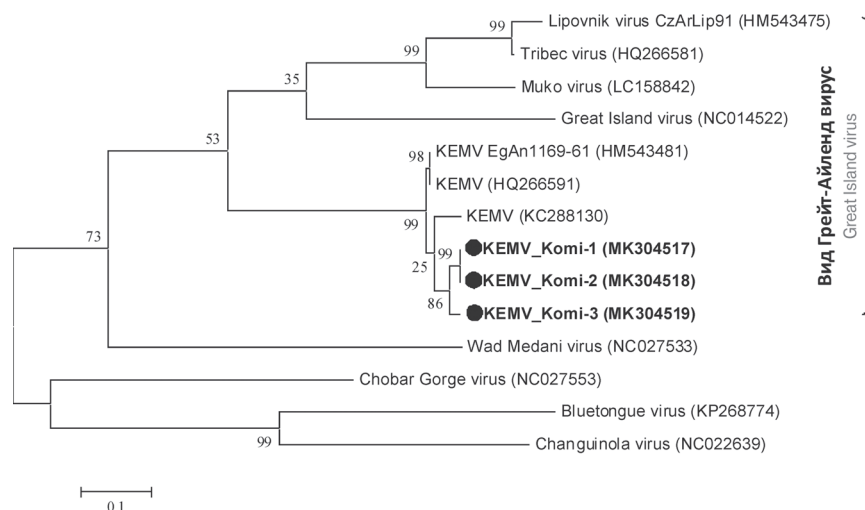


Рисунок 2. Филогендрограмма, отображающая взаимосвязь исследуемых изолятов КЕМВ (●) и других известных близкородственных орбивирусов

Figure 2. Phylogenetic tree which displaying a relationship between KEMV isolates (●) and other closely related orbiviruses

Примечание. Филогенетическое дерево построено на основе фрагмента (255 п.н.) сегмента 1 (VP1) с использованием метода максимального правдоподобия, модель эволюции GTR+I+G, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов. Note. Based on segment 1 (VP1) gene fragment (255 bp) by using the maximum likelihood estimation, GTR+I+G evolution model, support indices calculated per 1000 repetitions.

распространения этой птицы, пути ее миграции и широкое распространение в Республике Коми вполне удовлетворительно могут объяснить занос ВКЭ в Республику Коми и быстрое распространение таежных клещей в этом регионе при помощи птиц.

Нами впервые выявлен генетический материал КЕМВ на территории Республики Коми в клещах *I. persulcatus*. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента генома показало, что он имеет уровень гомологии приблизительно 94% в сравнении с другими известными последовательностями вируса Кемерово и, по всей вероятности, формирует две достаточно обособленные геногруппы КЕМВ в Республике Коми. Подобный уровень гомологии с известными вариантами вируса и наличие выраженных генетических групп КЕМВ позволяет высказать предположение о длительной циркуляции вируса Кемерово в природных очагах Республики Коми. К сожалению, информация о генетическом разнообразии и географическом распространении КЕМВ крайне ограничена. Это не позволяет точно оценить ареалы КЕМВ в северной Евразии и высказать гипотезу о возможных путях его распространения в России.

Вирус Кемерово относится к виду Great Island virus рода *Orbivirus* (орбивирусов) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=10892>). Данный вид включает в себя еще 5 вирусов, которые широко распространены в различных географических регионах мира. Факты обнаружения орбивирусов данного вида в Северной Америке, Северной Евразии и Австралии

подтверждают предположение о глобальном распространении этого вида вируса [13]. Его распространение связывают с перелетными (морскими) птицами и клещами, паразитирующими на них. Вполне вероятно, что именно перелетные птицы занесли орбивирусы в северо-восточные районы европейской части России. Значительный уровень обнаруженных генетических отличий у выделенных изолятов КЕМВ предполагает, что это произошло достаточно давно.

Таким образом, изучение генетического разнообразия ВКЭ и КЕМВ в таежных клещах из природных биотопов Республики Коми показало значительное генетическое разнообразие возбудителей клещевого энцефалита и лихорадки Кемерово. Данные филогеографического анализа позволяют предполагать циркуляцию не менее четырех геновариантов ВКЭ сибирского и дальневосточного генотипов, которые близки к вариантам ВКЭ, циркулирующим на Урале и в Сибирском регионе. Это позволяет высказать предположение о заносе ВКЭ в Республику Коми из этих регионов. Генетический материал вируса Кемерово был впервые обнаружен в таежных клещах в исследованном районе. Его секвенирование и анализ показали, что он весьма существенно отличается от известных ранее вариантов КЕМВ и представлен двумя геновариантами. По всей вероятности, это свидетельствует о том, что эволюция вируса Кемерово на северо-востоке европейской части РФ протекала независимо и достаточно длительное время. Типичным хозяином для данного вида орбивирусов являются перелетные птицы и клещи, паразитирующие

на них [13]. Выявление КЕМV в таежных клещах свидетельствует о циркуляции этого вируса в биотопах данного региона.

Выявленные варианты ВКЭ и КЕМV способны вызывать заболевания человека, причем с весьма необычной клиникой. Это различные формы хронического клещевого энцефалита с длительным инкубационным периодом, тяжелые формы КЭ с высоким уровнем летальности. По всей вероятности, новые варианты КЕМV также могут вызывать заболевания с разнообразной клинической картиной вирусной инфекции у человека. Однако отсутствие диагностических средств, адаптированных для выявления генетически разнородных вариантов ВКЭ и КЕМV, безусловно, затруднит проведение диагностики этих инфекций у населения Республики Коми.

Представляется, что уточнение ареалов распространения различных генотипов ВКЭ и вируса Кемерово, изучение вариативности их геномов является принципиальным моментом для улучшения диагностики, профилактики и лечения этих инфекционных клещевых заболеваний в Республике Коми и других северо-восточных регионах европейской части России.

Благодарности

Исследования поддержаны Российской федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (государственное задание ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора № 141-00069-18-01 от 17.03.2018).

Список литературы/References

1. Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Возбудители инфекционных заболеваний в организме таежного клеща на территории Республики Коми // Дезинфекционное дело. 2012. № 1. С. 52–55. [Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Yu.I., Ternovoj V.A., Protopopova E.V., Mikryukova T.P., Kononova Yu.V., Chausov E.V., Loktev V.B. Pathogens of infectious diseases in ixodes persulcatus on the territory of the Komi Republic. *Dezinfektsionnoe delo = Desinfection Affairs*, 2012, no. 1, pp. 52–55. (In Russ.)]
2. Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В., Коновалова С.Н., Тупота Н.Л., Карташов М.Ю., Чаусов Е.В., Локтев В.Б., Егорова Ю.И. Выявление возбудителей заболеваний в Ixodes persulcatus на территории Республики Коми // Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 111, № 4. С. 88–91. [Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Ternovoj V.A., Protopopova E.V., Mikryukova T.P., Kononova Yu.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Kartashov M.Yu., Chausov E.V., Loktev V.B., Egorova Yu.I. Detection of causative agents in Ixodes persulcatus in the Komi Republic. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2012, vol. 111, no. 4, pp. 88–91. (In Russ.)]
3. Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах Ixodes persulcatus на северо-восточном регионе Европейской части России // Паразитология. 2014. Т. 48, № 2. С. 131–149. [Mikryukova T.P., Chausov E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V., Protopopova E.V., Kartashov M.Yu., Ternovoj V.A., Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Yu.I., Loktev V.B. Genetic diversity of tick-borne encephalitis virus in Ixodes persulcatus ticks in the northeast region of the European part of Russia. *Parazitologiya = Parasitology*, 2014, vol. 48, no. 2, pp. 131–149. (In Russ.)]
4. Сафонова М.В., Дедков В.Г., Гмыль А.П., Крганова Г.Г., Сперанская А.С., Неверов А.Д., Федонин Г.Г., Валдохина А.В., Пимкина Е.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. Изучение генетического разнообразия вируса Кемерово // Национальные приоритеты России. 2016. № 4 (22). С. 96–100. [Safonova M.V., Dedkov V.G., Gmyl' A.P., Karganova G.G., Speranskaya A.S., Neverov A.D., Fedonin G.G., Valдохина A.V., Pimkina E.V., Markelov M.L., Shipulin G.A. Study of genetic diversity of Kemerovo virus. *Natsional'nye priorityety Rossii = Nacional'nye priorityety Rossii*, 2016, vol. 22, no. 4, pp. 96–100. (In Russ.)]
5. Dai X., Shang J., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.*, 2018, no. 7. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6
6. Dedkov V.G., Markelov M.L., Gridneva K.A., Bekova M.V., Gmyl A.P., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Romanova L.Iu., Pogodina V.V., Yakimenko V.V., Shipulin G.A. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. *Ticks Tick-Borne Dis.*, 2014, vol. 5, no. 6, pp. 651–655. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.017
7. Dilcher M., Hasib L., Lechner M., Wieseke N., Middendorf M., Marz M., Koch A., Spiegel M., Dobler G., Hufert F.T., Weidmann M. Genetic characterization of Tribec virus and Kemerovo virus, two tick-transmitted human-pathogenic Orbiviruses. *Virology*, 2012, vol. 423, no. 1, pp. 68–76. doi: 10.1016/j.virol.2011.11.020
8. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.*, 1999, vol. 80 (Pt.1), pp. 179–185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179
9. Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A., de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, 2007, vol. 361, no. 1, pp. 80–92. doi: 10.1016/j.virol.2006.09.015
10. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.*, 2003, vol. 57, no. 1–2, pp. 129–146. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1
11. Hubálek Z., Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.*, 2012, vol. 111, no. 1, pp. 9–36. doi: 10.1007/s00436-012-2910-1
12. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2015, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
13. Major L., Linn M.L., Slade R.W., Schroder W.A., Hyatt A.D., Gardner J., Cowley J., Suhrbier A. Ticks associated with Macquarie island penguins carry arboviruses from four genera. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 2. doi: 10.1371/journal.pone.0004375
14. Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyuten'kov O.Y., Protopopova E.V., Romanenko V.N., Chausov E.V., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A.,

- Loktev V.B. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ixodes ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks and Tick-Borne Dis.*, 2014, vol. 5, no. 2, pp. 145–151. doi: 10.1016/j.tbd.2013.10.004
15. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
 16. Tkachev S.E., Tikunov A.Y., Babkin I.V., Livanova N.N., Livanov S.G., Panov V.V., Yakimenko V.V., Tantsev A.K., Taranenko D.E., Tikunova N.V. Occurrence and genetic variability of Kemerovo virus in Ixodes ticks from different regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan. *Infect. Genet. Evol.*, 2017, vol. 47, pp. 56–63. doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.007
 17. Tokarevich N.K., Tronin A.A., Blinova O.V., Buzinov R.V., Boltentkov V.P., Yurasova E.D., 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
 18. Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. Impact of air temperature variations on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: the case of Komi Republic. *Int. J. Circumpolar. Health*, 2017, vol. 76, no. 1: 1298882. doi: 10.1080/22423982.2017.1298882

Авторы:

Карташов М.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия; научный сотрудник лаборатории биотехнологии и вирусологии, Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия;

Микрокова Т.П., к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Кривошеина Е.И., стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия; магистр кафедры биотехнологии Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск, Россия;

Кузнецов А.И., стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия; магистр кафедры информационной биологии Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск, Россия;

Глушкова Л.И., д.м.н., профессор, руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия;

Корабельников И.В., д.м.н., профессор, директор ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора, г. Сыктывкар, Россия;

Егорова Ю.И., энтомолог ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора, г. Сыктывкар, Россия;

Терновой В.А., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Локтев В.Б., д.б.н., профессор, зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, Россия; профессор, кафедра биомедицинской физики, Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия; ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярных механизмов патологических процессов ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Kartashov M.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Researcher, Biotechnology and Virology Laboratory, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation;

Mikryukova T.P., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Krivosheina E.I., Research Assistant, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Master, Chair of Biotechnology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation;

Kuznetsov A.I., Research Assistant, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Master, Chair of Information Biology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation;

Glushkova L.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Komi Republic Department of Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protections and Human Well-Being, Syktyvkar, Russian Federation;

Korabel'nikov I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the “Disinfection”, Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protections and Human Well-Being, Syktyvkar, Russian Federation;

Egorova Yu.I., Entomologist, “Disinfection”, Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protections and Human Well-Being, Syktyvkar, Russian Federation;

Ternovoi V.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology of Highly Dangerous Infections, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Loktev V.B., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Professor, Chair of Biomedical Physics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of the Molecular Mechanisms of Pathological Processes, Institute of Cytology and Genetics the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.02.2019
Отправлена на доработку 19.06.2019
Принята к печати 16.09.2019

Received 12.02.2019
Revision received 19.06.2019
Accepted 16.09.2019

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ СОСТАВ КРОВИ, ГЕМОГРАММА, МОРФОМЕТРИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ И ТЕЛА КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СЛЮНЫ *HIRUDO VERBANA*

Р.Ф. Аминов, А.К. Фролов, Е.Р. Федотов

Запорожский национальный университет, г. Запорожье, Украина

Резюме. Медицинское сообщество отмечает устойчивую тенденцию к увеличению частоты аллергических заболеваний вследствие использования синтетических фармацевтических препаратов и влияния неблагоприятных факторов окружающей среды. В этой связи все большую актуальность приобретают терапевтические подходы, основанные на использовании естественных, природных средств. К их числу относится гирудотерапия. Половозрелых самок нелинейных крыс, которым за 2 недели до и через 2 недели после спаривания выполняли приставки медицинской пиявки (МП) массой 400 ± 10 мг в подлопаточную область, выводили из эксперимента на 60 суток вскармливания приплода и исследовали. Крысят приплода исследовали на 1, 15, 30, 45, 60 суток. Сроки проведения эксперимента были выбраны с учетом возрастных периодов у крыс: 1–5 суток жизни соответствуют периоду новорожденности, 6–21 сутки — подсосному периоду, 22–50 суток — периоду становления половой зрелости, и наконец, с 60 суток начинается период половой зрелости. Всего в эксперименте было использовано 40 самок нелинейных крыс и 200 крысят их приплода. После измерения морфометрических показателей тела всех животных декапитировали под эфирным наркозом, затем выполняли вскрытие, собирали кровь в стерильную центрифужную пробирку с 2% кристаллическим гепарином (8:1) (Spofa, Чехия) и исследовали ее унифицированными методами, определяя общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу крови, общее количество эритроцитов, гемоглобин, цветной показатель. Фиксировались морфометрические показатели селезенки и тимуса. Статистическую обработку результатов проводили методом вычисления средней арифметической, ошибки средней арифметической, среднего квадратичного отклонения с помощью компьютерных программ SPSS v. 21.0 и Microsoft Office Excel 2010. Достоверность различий между средними величинами оценивали по критерию Стьюдента: различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Результатом наших исследований стало выявление иммуностимулирующего воздействия слюны МП на морфометрические показатели тела и основных органов иммунной системы крыс (тимуса и селезенки). У потомства опытной группы, начиная с первых суток, увеличивалось количество лейкоцитов, эритроцитов, повышался уровень гемоглобина. Проведенное исследование убедительно продемонстрировало стимулирующее влияние слюны МП на гистогенетические реакции на изученных этапах онтогенеза у самок крыс и их потомства, причем у самок данный морфогенетический эффект сохранялся спустя более чем 70 суток после последней постановки МП. Изменения морфологических и гематологических показателей свидетельствуют об активации морфогенетической функции иммунитета под влиянием биологически активных веществ МП.

Ключевые слова: гирудотерапия, медицинская пиявка, биологически активные вещества, морфометрические показатели тела.

Адрес для переписки:

Аминов Руслан Флузович
69600, Украина, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66,
Запорожский национальный университет.
Тел.: +3 066 137-43-91.
E-mail: 91_amin_91@mail.ru

Contacts:

Ruslan F. Aminov
69900, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovski str., 66,
Zaporizhzhya National University.
Phone: +3 066 137-43-91.
E-mail: 91_amin_91@mail.ru

Библиографическое описание:

Аминов Р.Ф., Фролов А.К., Федотов Е.Р. Лейкоцитарный состав крови, гемограмма, морфометрия лимфоидных органов и тела крысы под влияние биологически активных веществ слюны *Hirudo verbana* // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 167–174. doi: 10.15789/2220-7619-LBC-632

Citation:

Aminov R.F., Frolov A.K., Fedotov Ye.R. Rat peripheral blood leukocyte subset composition, hemogram, lymphoid organ and body morphometry after exposure to biologically active substances derived from *Hirudo verbana* saliva // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 167–174. doi: 10.15789/2220-7619-LBC-632

RAT PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE SUBSET COMPOSITION, HEMOGRAM, LYMPHOID ORGAN AND BODY MORPHOMETRY AFTER EXPOSURE TO BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES DERIVED FROM *HIRUDO VERBANA SALIVA*

Aminov R.F., Frolov A.K., Fedotov Ye.R.

Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine

Abstract. Medical community has noted that the prevalence of allergic diseases by steadily tends to rise resulting from using synthetic drugs ecological catastrophe. In this regard, more and more attention is increasingly being paid to natural therapeutic approaches, one of which is based on applying hirudotherapy. There were used 40 pubescent outbred female rats and their 200 pups born during experiment. In particular, female rats underwent leeching in the subscapular region 2 weeks before and 2 weeks after mating by applying medical leeches weighing 400 ± 10 mg. Next, relevant progeny was examined at day 1, 15, 30, 45, and 60 after birth, whereas female rats — after weaning. Experiment was designed to assess diverse parameters in accordance with the age-related rat development: newborn pups — 1–5 days old, day 6–21 — suckling period, day 22–50 — onset of puberty, day 60 onward — puberty. After measuring body morphometric parameters, female rats were sacrificed by decapitation under ether narcosis on day 60, whereas rat pups — at various time points. followed by autopsy and collecting blood sample into a sterile centrifuge tube by using 2% Spofa crystalline heparin (8:1) to be further examined by standard assays: morphometry of rat body, spleen and thymus; measuring total leukocyte count; CBC with differential; RBC; hemoglobin level; color index. Statistical data processing was performed by calculating arithmetic mean, error of arithmetic mean, standard deviation by using SPSS version 21.0 and Microsoft Office Excel 2010 software. Significance of differences was estimated by using Student's t test, and set at $p \leq 0.05$. Our study demonstrated medical leech saliva components applied during hirudotherapy exerted an immune-augmenting effect of on morphometric body, thymus and spleen parameters. Moreover, starting from day 1, total leukocyte count, RBC, and hemoglobin level were increased in the experimental group. Moreover, we convincingly demonstrated a stimulatory effect of medical leech saliva components on histogenetic reactions at various ontogenetic stages in both female rats and their progeny. In the former, such morphogenetic effect was maintained for more than 70 days after the last leeching: on week 2 after mating and 30 days after delivery. Changes in morphological and hematological evidence about enhanced morphogenetic function of immune system in response to saliva-derived biologically active substances released by medicinal leeches.

Key words: hirudotherapy, medical leech, biologically active substances, morphometric indices of the body.

Введение

Медицинское сообщество отмечает устойчивую тенденцию к хронизации патологий и увеличению аллергических заболеваний, являющуюся следствием техногенного прессинга на внешнюю среду и экспансии синтетических лечебных средств [5, 8, 10, 12, 15, 16, 21, 27]. В этой связи все большее внимание приобретают натуротерапевтические подходы, одним из которых является гирудотерапия (ГТ) [1, 13, 22–26, 28]. Человек и водопойные животные (в основном копытные) в ходе эволюции и формирования мутуалистических отношений с пиявками, адаптировались к их биологически активным веществам (БАВ). Поэтому ГТ обеспечивает широкий спектр терапевтических эффектов при практически полном отсутствии побочных негативных последствий. Количество противопоказаний к ГТ минимально — это патология гемостаза, онкологические заболевания, пограничные состояния здоровья и беременность [9, 11]. Однако ряд гирудотерапевтов [6, 7, 9, 11, 17] считают последнюю относительным противопоказанием, допуская превентивные приставки медицинской пиявки (МП) при угрозе развития тромбозов, гестозов, полагая, что ГТ приводит к улучшению кровоснабжения тканей ма-

тери и плода, и ссылаясь на отсутствие данных о тератогенном действии БАВ МП. Если принять во внимание положительное влияние БАВ МП на регенеративные процессы [18], то можно рассчитывать на подобный морфогенетический эффект и у плода. Ранее нами было показано, что большинство терапевтических эффектов ГТ опосредуется иммунной системой [1, 22–24], тогда как участие последней в антигенструктурном гомеостазе организма проявляется через основную морфогенетическую функцию — контроль и регуляцию метаболизма, пролиферации и дифференцировки клеток всех тканей [2–4, 18]. Поэтому целью наших исследований стало изучение морфометрических и гематологических показателей крыс на ранних этапах постэмбрионального развития на фоне внутриутробной нагрузки БАВ слюны *Hirudo verbana* в процессе гирудовлияния.

Материалы и методы

Половозрелым нелинейным самкам крыс в возрасте 4 месяцев фиксировали в станке для фиксации и проводили приставки МП массой $0,4 \pm 0,01$ г 4-кратно с интервалом 1 неделя, за 2 недели до и в течение 2 недель после спаривания с самцами того же возраста. Самок конт-

рольной группы животных также фиксировали в фиксационном станке, но без приставок МП, с последующим спариванием с самцами. Приплод, полученный от самок опытной и контрольной групп, исследовали в динамике на 1, 15, 30, 45, 60 сутки. Самок выводили из эксперимента на 60 сутки вскармливания приплода. Сроки проведения эксперимента были выбраны с учетом общепризнанных возрастных периодов у крыс. Так, 1–5 сутки жизни соответствуют периоду новорожденности, 6–21 сутки — подсосному периоду, 22–50 сутки — периоду становления половой зрелости, и наконец, с 60 суток наступает период половой зрелости. Всего в эксперименте было использовано 40 самок нелинейных крыс и 200 крысят их приплода. Всех животных декапитировали под эфирным наркозом после измерения морфометрических показателей тела (массы, длины, длины хвоста, окружности грудной клетки и окружности живота. После этого проводили вскрытие животных и собирали кровь в силиконированную стерильную центрифужную пробирку с 2% кристаллическим гепарином (8:1) (Spofa, Чехия). Далее исследовали морфометрические показатели селезенки и тимуса: массу, ширину и длину (с помощью штангенциркуля); гематологические показатели (количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу крови, количество эритроцитов, гемоглобин) определяли унифицированными методами. Статистическую обработку результатов проводили методом вычисления средней арифметической, ошибки средней арифметической, среднего квадратичного отклонения с помощью компьютерных программ SPSS v. 21.0 и Microsoft Office Excel 2010. Достоверность различий между средними величинами оценивали по критерию Стьюдента: различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Изучение цитологических и морфометрических показателей самок, подвергнутых постановкам МП до и во время беременности, и их приплода на разных этапах раннего онтогенеза выявило однонаправленные изменения с тенденцией к увеличению показателей по сравнению с животными контрольной группы ($p \leq 0,05$) (табл. 1, 2, 3, 4). Так, у опытных самок, которые были выведены из эксперимента на 60 сутки после родов, достоверно увеличивались все морфометрические параметры тела, но наибольшая амплитуда прироста отмечалась для показателей массы тела, которая увеличивалась по сравнению с контрольной группой животных на 7,5% ($p \leq 0,05$) (табл. 1).

Как и следовало ожидать, при анализе органов кроветворения и иммунной системы реги-

Таблица 1. Морфометрические показатели тела самок и их приплода, $X \pm SE$

Table 1. Morphometric body parameters for female rats and their progeny, $X \pm SE$

Группа животных Group of animals	Показатели тела самок и их приплода/Morphometric parameters of female rats and their progeny					
	Масса тела, г Body weight, g	Длина тела, см Body length, cm	Длина хвоста, см Tail length, cm	Окружность грудной клетки, см Chest circumference, cm	Окружность живота, см Abdominal circumference, cm	
Самки Mature females	243,4±10,4	19,7±0,9	16,9±0,4	16,1±0,4	18,4±0,4	
Приплод 15 суток Offspring — 15 th day	261,5±7,2*	21,5±1,0	18,8±0,3*	17,1±0,3*	20,3±0,3*	
Приплод 30 суток Offspring — 30 th day	6,0±0,2	5,0±0,2	1,6±0,1	4,9±0,5	5,1±0,4	
Приплод 45 суток Offspring — 45 th day	6,8±0,3*	5,3±0,3	1,9±0,1*	5,0±0,7	5,2±0,2*	
Приплод 60 суток Offspring — 60 th day	21,5±1,4	8,3±0,4	5,1±0,2	6,9±0,2	7,8±0,2	
Приплод 15 суток Offspring — 15 th day	24,7±1,0*	8,6±0,4	4,9±0,1	8,0±0,2*	8,4±0,2*	
Приплод 30 суток Offspring — 30 th day	48,2±2,1	11,0±0,5	8,0±0,5	8,6±0,3	10,0±0,4	
Приплод 45 суток Offspring — 45 th day	59,9±2,3*	12,8±0,7*	9,4±0,6*	9,6±0,9*	11,1±0,4*	
Приплод 60 суток Offspring — 60 th day	105,4±7,2	15,3±0,4	14,1±0,3	11,8±0,2	13,3±0,4	
Приплод 15 суток Offspring — 15 th day	123,1±5,1*	16,0±0,2	14,4±0,4	12,5±0,3*	14,1±0,3*	
Приплод 30 суток Offspring — 30 th day	146,3±4,5	16,9±0,3	15,2±0,2	13,0±0,2	14,2±0,2	
Приплод 45 суток Offspring — 45 th day	166,5±6,3*	18,3±0,3*	16,1±0,2*	14,2±0,3*	15,8±0,3*	

Примечание. *Показатели, достоверно отличающиеся от контроля ($p \leq 0,05$).

Note. *Significant differences compared to control group ($p \leq 0,05$).

стрировались наибольшие изменения их массы. Так, масса тимуса опытной группы самок возросла на 34,5%, а масса селезенки — на 19,8% ($p \leq 0,05$ для обоих показателей) (табл. 2).

Достоверно увеличивались, но в меньшей степени, и другие морфометрические показатели у опытной группы самок. Увеличение массы тимуса и селезенки у опытных самок сопровождалось соответствующим ростом гематологических показателей: количество лейкоцитов в артериовенозной крови увеличилось на 54%, количество эритроцитов — на 24%, гемоглобина — на 16% ($p \leq 0,05$ для всех показателей) (табл. 3). В то же время лейкоцитарная формула не менялась (табл. 4).

Как мы уже отмечали, у приплода крыс опытной группы также имело место разное увеличение изучаемых показателей. Наиболее показательным было увеличение массы тела. Максимальная амплитуда данного увеличения наблюдалась в активный подсосный период — на 15,2%, и в периоды начала полового

созревания и становления половой зрелости — на 24,2 и 13,8% соответственно. Достоверных различий достигали и другие морфометрические показатели (табл. 1). Соответственно увеличению морфометрических показателей тела в опытной группе потомства крыс, отмечалось увеличение морфометрических показателей тимуса и селезенки. В наибольшей степени менялась масса органов. Для тимуса увеличение составляло 28,12; 49,83 и 16,87%, для селезенки — 50,39; 49,78 и 54,81% на 15, 30 и 45 сутки жизни соответственно по сравнению с животными контрольной группы ($p \leq 0,05$) (табл. 2). У потомства крыс опытной группы также увеличивались показатели «красной крови» и лейкоцитов, причем наибольшая степень этих изменений регистрировалась до 30 суток жизни, а к концу срока наблюдения — на 45 и 60 сутки — данные показатели у групп наблюдения статистически не отличались (табл. 3). Видимой патологии внутренних органов у опытной группы животных нами зарегистрировано не было,

Таблица 2. Морфометрические показатели тимуса и селезенки самок и их приплода, $X \pm SE$

Table 2. Morphometric parameters of the thymus and spleen of females and their offspring, $X \pm SE$

Показатели иммуногенных органов самок и их приплода Immune-organ morphometric parameters for female rats and their progeny							
Группа животных Group of animals		Тимус Thymus			Селезенка Spleen		
		Масса, мг Weight, mg	Длина, см Length, cm	Ширина, см Width, cm	Масса, мг Weight, mg	Длина, см Length, cm	Ширина, см Width, cm
Самки Mature females	Контроль Control	169,6±9,9	0,9±0,1	0,9±0,1	579,4±25,3	3,4±0,2	0,8±0,1
	Эксперимент Experiment	228,1±15,5*	1,1±0,1	1,1±0,1	694,2±27,4*	3,6±0,2	0,9±0,1
Приплод 1 сутки Offspring — 1 st day	Контроль Control	9,4±1,0	0,22±0,04	0,2±0,04	15,2±0,8	0,83±0,05	0,2±0,04
	Эксперимент Experiment	15,3±1,24*	0,34±0,05*	0,3±0,04*	21,2±2,6*	1,0±0,1*	0,2±0,05
Приплод 15 сутки Offspring — 15 th day	Контроль Control	70,75±6,89	0,8±0,07	0,7±0,07	56,5±4,7	1,4±0,1	0,4±0,04
	Эксперимент Experiment	90,6±6,8*	0,9±0,04	0,7±0,08	85,0±5,3*	1,7±0,13*	0,4±0,05
Приплод 30 сутки Offspring — 30 th day	Контроль Control	110,0±5,3	1,0±0,1	0,9±0,08	116,2±5,81	1,90±0,16	0,5±0,05
	Эксперимент Experiment	164,8±9,7*	1,2±0,1	1,2±0,12*	174,0±8,9*	2,2±0,2*	0,6±0,04*
Приплод 45 сутки Offspring — 45 th day	Контроль Control	272,8±13,7	1,3±0,1	1,4±0,13	427,8±45,1	2,8±0,2	0,7±0,03
	Эксперимент Experiment	335,7±16,0*	1,5±0,1*	1,6±0,1*	662,3±30,4*	3,4±0,3*	1,0±0,06*
Приплод 60 сутки Offspring — 60 th day	Контроль Control	397,0±17,4	1,5±0,12	1,6±0,1	524,1±23,9	3,0±0,3	0,7±0,05
	Эксперимент Experiment	404,8±18,4	1,7±0,1	1,8±0,2	753,5±43,7*	3,6±0,3	1,0±0,07*

Примечание. *Показатели, достоверно отличающиеся от контроля ($p \leq 0,05$).

Note. *Significant differences compared to control group ($p \leq 0.05$).

что свидетельствует об отсутствии тератогенного эффекта БАВ МП. Примечательно, что увеличение количества лейкоцитов у опытной группы самок и их потомства происходило без существенных изменений в лейкоцитарной формуле крови (табл. 4), что также указывает на гомеостатическое морфогенетическое влияние БАВ МП на дифференцировку гемопоэтических тканей.

Обсуждение

Проведенное исследование убедительно продемонстрировало стимулирующее влияние БАВ слюны МП на гистогенетические реакции в разные периоды онтогенеза самок крыс и их потомства. Причем у самок морфогенетический эффект сохранялся на протяжении более 70 суток после последней постановки МП. Потомство опытных крыс подвергалось трансплацентарному воздействию БАВ слюны МП в эмбриональном периоде. Следовательно, та-

кой выраженный и пролонгированный морфогенетический эффект БАВ слюны МП может быть следствием нескольких аддитивных механизмов. Так, собственно компоненты слюны МП частично адсорбируются в прилегающих к ранке тканях и частично поступают во внутреннюю среду организма животных, осуществляя активацию гистогенетических реакций. Косвенное подтверждение данного предположения было получено в экспериментах *in vitro*. Биологически активные вещества МП в культуре эмбриональной нервной ткани цыпленка проявляли нейротрофический эффект — стимулировали рост нервных волокон. В культуре лимфоцитов доноров антигены солевого экстракта из тел МП индуцировали синтез провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-8, TNF α) и реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), переходящую, в конечном итоге, в апоптоз [19, 20]. Авторы отмечают, что уровни синтеза цитокинов и РБТЛ не зависели от предшествующей сенсibilизации лимфоцитов

Таблица 3. Содержание лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина и цветной показатель у самок и их приплода, $\bar{X} \pm SE$

Table 3. Estimation of total leukocyte count, RBC, hemoglobin level, color index in female rats and their progeny, $\bar{X} \pm SE$

Группа животных Group of animals		Показатели Indicators			
		Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ Leucocytes, $10^9/\text{l}$	Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$ Erythrocytes, $10^{12}/\text{l}$	Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	Цветной показатель Color index
Самки Mature females	Контроль Control	5,0 \pm 0,25	7,1 \pm 0,40	136,1 \pm 4,81	0,58 \pm 0,06
	Эксперимент Experiment	7,7 \pm 0,66*	8,8 \pm 0,29*	158,4 \pm 3,64*	0,54 \pm 0,05
Приплод 1 сутки Offspring — 1 st day	Контроль Control	5,8 \pm 0,35	2,8 \pm 0,10	62,7 \pm 2,72	0,66 \pm 0,07
	Эксперимент Experiment	7,7 \pm 0,55*	3,1 \pm 0,22	83,8 \pm 2,74*	0,81 \pm 0,08
Приплод 15 сутки Offspring — 15 th day	Контроль Control	6,7 \pm 0,54	4,2 \pm 0,18	79,5 \pm 1,65	0,57 \pm 0,06
	Эксперимент Experiment	7,9 \pm 0,51*	3,7 \pm 0,29	86,2 \pm 3,47*	0,70 \pm 0,07
Приплод 30 сутки Offspring — 30 th day	Контроль Control	4,4 \pm 0,30	3,8 \pm 0,13	90,9 \pm 3,10	0,72 \pm 0,07
	Эксперимент Experiment	5,4 \pm 0,29*	4,8 \pm 0,22*	102,0 \pm 3,45*	0,64 \pm 0,06
Приплод 45 сутки Offspring — 45 th day	Контроль Control	6,8 \pm 0,51*	5,2 \pm 0,14	143,2 \pm 5,44*	0,83 \pm 0,09
	Эксперимент Experiment	7,1 \pm 0,31	5,1 \pm 0,33	140,5 \pm 6,07	0,83 \pm 0,08
Приплод 60 сутки Offspring — 60 th day	Контроль Control	7,3 \pm 0,45	6,6 \pm 0,19	155,1 \pm 5,73	0,70 \pm 0,07
	Эксперимент Experiment	8,2 \pm 0,45*	6,5 \pm 0,20	153,3 \pm 5,02	0,71 \pm 0,07

Примечание. *Показатели, достоверно отличающиеся от контроля ($p \leq 0,05$).

Note: *Significant differences compared to control group ($p \leq 0.05$).

Таблица 4. Лейкоцитарная формула крови самок и их приплода, X±SE
 Table 4. CBC with differential in female rats and their progeny, X±SE

Группа животных Group of animals	Лейкоцитарная формула крови, % CBC with differential, %						
	Нейтрофилы/Neutrophils		Лимфоциты Lymphocytes	Моноциты Monocytes	Эозинофилы Eosinophils		
	Палочкоядерные Band neutrophils	Сегментоядерные Segmented				Общий процент The total percentage	
Самки Mature females	Контроль/Control	8,01±2,71	14,4±3,5	22,41±4,15	70,16±4,57	7,4±2,62*	–
	Эксперимент/Experiment	12,61±3,32	13,9±3,46	26,51±4,41	70,31±4,46	2,26±1,49	0,46±0,06*
Приплод 1 сутки Offspring — 1 st day	Контроль/Control	8,68±2,81	43,29±4,95	51,97±5,0	46,76±4,99	1,25±1,11	–
	Эксперимент/Experiment	9,92±2,99	41,95±4,93	51,87±5,0	46,8±4,99	1,18±1,08	0,17±0,02*
Приплод 15 сутки Offspring — 15 th day	Контроль/Control	4,95±2,17	16,62±3,72	21,57±4,11	76,9±4,03	1,51±1,2	–
	Эксперимент/Experiment	5,87±2,35	14,22±3,49	20,09±4	79,58±4,03	0,62±0,05	–
Приплод 30 сутки Offspring — 30 th day	Контроль/Control	5,1±2,2	11,9±3,24	17±3,76	81,87±3,85	0,47±0,06*	0,63±0,05*
	Эксперимент/Experiment	4,66±2,11	15,97±3,66	20,63±4,05	78,93±4,08	0,1±0,01	0,09±0,01
Приплод 45 сутки Offspring — 45 th day	Контроль/Control	2,69±1,62	10,32±3,04	13,01±3,3	85,86±3,48	1,24±1,1	0,01±0,005
	Эксперимент/Experiment	6,43±2,45	11,53±3,06	17,96±3,75	81,40±3,81	0,17±0,02	0,17±0,02*
Приплод 60 сутки Offspring — 60 th day	Контроль/Control	3,64±1,87	8,2±2,75	11,84±3,24	86,68±3,5	1,47±1,1	–
	Эксперимент/Experiment	3,7±1,89	12,48±3,3	16,18±3,56	82,9±3,76	1,04±1,1	–

Примечание. *Показатели, достоверно отличающиеся от контроля (p ≤ 0,05).
 Note. *Significant differences compared to control group (p ≤ 0,05).

антигенами МП. Поэтому данный факт они объясняют наличием общих паттернов на биополимерах МП и человека, а также присутствием рецепторов к ним на иммунокомпетентных клетках доноров. Учитывая широкое межвидовое распространение сходных паттернов на биополимерах, подобное объяснение можно спроецировать и на обнаруженный нами морфогенетический эффект у самок крыс и их потомства. Так, поступившие в общую рециркуляцию БАВ МП слюны через их паттерны оказывают стимулирующий эффект, вызывая активацию гистогенеза через общие гомеостатические системы: нервную, эндокринную и иммунную. При этом иммунной системе отводится особая роль. В настоящее время имеются данные о главенстве морфогенетической функции иммунитета, которая заключается в контроле и регуляции метаболизма, пролиферации и дифференцировки клеток всех тканей, обеспечивающих их физиологическую и репаративную регенерацию [2–4, 18]. Среди лимфоцитов обнаружены даже клоны, индуцирующие реализацию всех генотипических нюансов исходной тканевой архитектуры клеток при репаративной регенерации у линейных крыс [4]. Иммуномодулирующие сдвиги хелперно-супрессорного баланса в субпопуляции лимфоидных клеток у больных с сердечно-сосудистой патологией после курса ГТ также свидетельствует о коррекции репаративного морфогенеза. Следовательно, только с позиций морфогенетической функции иммунитета можно объяснить полученные нами положительные морфогенетические и цитологические сдвиги в опытной группе самок после четырех приставок МП. Кроме увеличения морфогенетических показателей тела, у них зарегистрирована стимуляция гистогенеза миелоидной и лимфоидной тканей, что выразилось в увеличении морфогенетических показателей тимуса и селезенки, показателей «красной крови» и содержания лейкоцитов в периферической крови. Активацией морфогенетических реакций у самок опытной группы крыс, прежде всего в органах кроветворения и в лимфоидных органах, можно объяснить аналогичные гистогенетические процессы у их потомства. Причем более заметное стимулирующее рост влияние БАВ МП, проявлялось у потомства самок опытной группы на первом месяце жизни — в подсосном периоде, тогда как в период становления половой зрелости (45–60 сутки), когда преобладают дифференцировочные процессы в гистогенезе, морфогенетические реакции в опытной группе потомства были менее контрастны по сравнению с контрольной группой. Сходные морфогенетические и функциональные изменения под влиянием БАВ МП были описаны в экспериментах с мелким рога-

тым скотом [2]. После 3-х курсов гирудопункций у опытного стада коз улучшалось общее физиологическое состояние, гематологические и иммунологические показатели, увеличивалась масса тела, удоимость, репродуктивная способность, отсутствовали осложнения беременности (маститы). Положительное действие гирудопунктуры продемонстрировано также в экспериментах на крупном рогатом скоте (коровы) [14]. Показано положительное влияние на ход беременности и репаративные изменения

репродуктивных органов после беременности. Приведенные данные свидетельствуют о модулирующем влиянии БАВ слюны МП в процессе гирудотерапии на морфогенетические процессы, которые опосредованы, в основном, факторами иммунной системы. Поэтому БАВ МП имеют перспективу для дальнейшего изучения их влияния на морфогенетические реакции на всех этапах онтогенеза, включая преэмбриональный и эмбриональный периоды, не только у животных, но и у человека.

Список литературы/References

1. Амінов Р.Ф., Фролов О.К. Проліферативна активність клітин кісткового мозку шурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. [Aminov R.F., Frolov O.K. The proliferative activity of rat bone marrow cells due to the influence of biologically active substances of medical leeches]. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2017, vol. 8, no. 4, pp. 501–505. doi: 10.15421/021777 (In Ukr.)
2. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы. М.: Издательство РАМН, 2009. 336 с. [Babaeva A.G. Regeneration: facts and perspectives. Moscow: Publishing house RAMS, 2009. 336 p. (In Russ.)]
3. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Издательство РАМН, 2009. 108 с. [Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov Ye.A. The role of lymphocytes in the operative change of tissue development program. Moscow, Publishing House RAMS, 2009. 108 p. (In Russ.)]
4. Бабаева А.Г. Еще раз о морфогенетической, или строительной функции лимфоцитов // Вестник российской академии естественных наук. 2010. № 4. С. 70–74. [Babaeva A.G. Once more on the morphogenetic or building function of lymphocytes. *Vestnik rossijskoj akademii estestvennyh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Natural Sciences*, 2010, no. 4, pp. 70–74. (In Russ.)]
5. Бабак О.Я. Лекарственные поражения печени: вопросы теории и практики // Лекарства. 2008. № 2 (118). С. 96–101. [Babak O.Ya. Medicinal lesions of the liver: questions of theory and practice. *Lekarstva = Medicines*, 2008, no. 2 (118), pp. 96–101. (In Russ.)]
6. Башкирцева Н.А. Лечимся пиявками. СПб.: Крылов, 2008. 128 с. [Bashkirtseva N.A. We are treated with leeches. St. Petersburg: Krylov, 2008. 128 p. (In Russ.)]
7. Баскова И.П., Исаханян Г.С. Гирудотерапия. М.: Монолит, 2004. 508 с. [Baskova I.P., Isakhanyan G.S. Hirudotherapy. Moscow: Monolith, 2004. 508 p. (In Russ.)]
8. Грицко Р.Ю., Задорожный А.М., Герасун А.Б., Пиняжко О.Р., Иванкив О.Л., Орфин А.Я., Дячок И.Л., Мироненко С.И. Гепатотоксичность лекарств // Гепатология. 2014. № 2 (24). С. 17–28. [Hrytsko R.Yu., Zadorozhnyi A.M., Herasun A.B., Pinyazko O.R., Ivankiv O.L., Orfin A.Ya., Dyachok I.L., Myronenko S.I. Hepatotoxicity of drugs. *Gepatologija = Hepatology*. 2014. no. 2 (24). pp. 17–28. (In Russ.)]
9. Герашенко Л. Все о пиявке. Гирудотерапия для разных типов людей. СПб.: Питер, 2007. 256 с. [Gerashchenko L. All about the leech. Hirudotherapy for different types of people. St. Petersburg: Piter, 2007. 256 p. (In Russ.)]
10. Демко И.В. Лекарственная аллергия // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 4. С. 84–87. [Demko I.V. Medicinal allergy. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2013, no. 4, pp. 84–87. (In Russ.)]
11. Жаров Д.Г. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками. Ростов н/Д.: Феникс, 2003. 320 с. [Zharov D.G. Secrets of hirudotherapy or how to be treated by leeches. Rostov-on-Don: Phoenix, 2003. 320 p. (In Russ.)]
12. Змушко Е.И., Белозеров Е.С. Медикаментозные осложнения. СПб.: Питер, 2001. 425 с. [Zmushko E.I., Belozеров E.S. Medication complications. St. Petersburg: Piter, 2001. 425 p. (In Russ.)]
13. Каменев О.Ю., Барановский А.Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. СПб.: ИГ «Весь», 2006. 304 с. [Kamenev O.Yu., Baranovskiy A.Yu. Treatment with leeches: theory and practice of hirudotherapy: a guide for physicians. St. Petersburg: Ves', 2006. 304 p. (In Russ.)]
14. Кондратьева М.М., Сидорова К.А., Глазунова Л.А. Влияние гирудина на гематологические показатели у коров при субклиническом мастите // Сельскохозяйственные науки. 2015. № 3 (30). С. 58–63. [Kondrateva M.M., Sidorova K.A., Glazunova L.A. Influence of hirudin on hematologic indices in cows with subclinical mastitis. *Sel'skhozjajstvennyye nauki = Agricultural Sciences*, 2015, no. 3 (30), pp. 58–63. (In Russ.)]
15. Мачарадзе Д.Ш. Аллергия на местные анестетики. Роль аллерголога // Лечащий врач. 2015. № 7. С. 66. [Macharadze D. Sh. Allergy to local anesthetics. The role of the allergist. *Lechashhij vrach = The Attending Physician*, 2015, no. 7, p. 66. (In Russ.)]
16. Мордык А.В., Иванова О.Г., Нагибина Л.А., Ситникова С.В., Марьехина О.А. Лекарственные поражения печени и их лечение в клинике туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 9. С. 47–52. [Mordyk A.V., Ivanova O.G., Nagibina L.A., Sitnikova S.V., Marekhina O.A. Medicinal lesions of the liver and their treatment in the tuberculosis clinic. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 9, pp. 47–52. (In Russ.)]
17. Савинов В.А. Гирудотерапия. М.: Медицина, 2004. 432 с. [Savinov V.A. Girudoterapiya. M.: Medicine, 2004. 432 p. (In Russ.)]
18. Фролов А., Копейка В., Федотов Е., Капустин С., Литвиненко Р. Влияние гирудотерапии на физиологические показатели у коз // Животноводство Украины. 2010. № 7. С. 7–10. [Frolov A., Kopeika V., Fedotov E., Kapustin S., Litvinenko R. Influence of hirudotherapy on physiological indices in goats. *Zhivotnovodstvo Ukrainy = Livestock of Ukraine*, 2010, no. 7, pp. 7–10. (In Russ.)]

19. Фролов А.К., Прилутский А.С., Лесниченко Д.А., Литвиненко Р.А., Федотов Е.Р., Мацегора А.С. Синтез интерлейкина-1 β культурами мононуклеаров, стимулированных растительным митогеном и антигенами колец // Вестник Запорожского национального университета. Биологические науки. 2015. № 1. С. 140–148. [Frolov A.K., Prilutsky A.S., Lesnichenko D.A., Litvinenko R.A., Fedotov Ye.R., Matsegora A.S. Synthesis of interleukin-1 β cultures of mononuclear cells stimulated by plant mitogen and ring antigens. Vestnik Zaporozhskogo nacional'nogo universiteta. *Biologicheskie nauki = Bulletin of Zaporozhye National University. Biological Sciences*, 2015, no. 1, pp. 140–148. (In Russ.)]
20. Фролов А.К., Литвиненко Р.А., Копейка В.В. Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами колец // Проблемы экологии та медицины. 2012. Т. 16, № 5–6. С. 37–40. [Frolov A.K., Litvinenko R.A., Kopeika V.V. Features of the reaction of blast transformation of blood lymphocytes of donors stimulated by plant lectins and ring antigens. *Problemy jekologii ta medicyny = Problems of Ecology and Medicine*, 2012, vol. 16, no. 5–6, pp. 37–40. (In Russ.)]
21. Швец Н.И., Бенца Т.М. Лекарственные поражения печени, связанные с приемом антибиотиков // Современная гастроэнтерология. 2009. № 3 (47). С. 43–49. [Shvets N.I., Bentsa T.M. Medicinal liver damage associated with taking antibiotics. *Sovremennaja gastrojenterologija = Modern Gastroenterology*, 2009, no. 3 (47), pp. 43–49. (In Russ.)]
22. Aminov R.F., Frolov A.K. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. *Ann. Parasitol.*, 2018, vol. 64, no. 1, pp. 13–20. doi:10.17420/ap6401.127
23. Aminov R. Cannibalism of the medical leeches *Hirudo verbana*. *Eurasia J. Biosci.*, 2019, vol. 13, no. 1, pp. 23–26.
24. Aminov R.F., Frolov A.K. Influence of ectoparasite — *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism — *rattus*. *Curr. Trends Immunol.*, 2017, vol. 18, pp. 107–117.
25. Grumbine N.A., Nicholas A. Feature: reviving an ancient therapy to manage chronic pain. *Podiatry Today*, 2003, vol. 16, pp. 46–53.
26. Hildebrandt J.P. Small bite, large impact — saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*, 2011, vol. 98, no. 12, pp. 995–1008. doi: 10.1007/s00114-011-0859-z
27. Lockwood A.M., Cole S., Rabinovich M. Azithromycin-induced liver injury. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2010, vol. 67, no. 10, pp. 810–814. doi: 10.2146/ajhp080687
28. Sobczak N., Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Ann. Parasitol.*, 2014, vol. 60, no. 2, pp. 89–92.

Авторы:

Аминов Р.Ф., аспирант кафедры физиологии, иммунологии и биохимии с курсом гражданской обороны и медицины Запорожского национального университета, г. Запорожье, Украина;

Фролов А.К., д.м.н., профессор кафедры физиологии, иммунологии и биохимии с курсом гражданской обороны и медицины Запорожского национального университета, г. Запорожье, Украина;

Федотов Е.Р., к.б.н., доцент кафедры физиологии, иммунологии и биохимии с курсом гражданской обороны и медицины Запорожского национального университета, г. Запорожье, Украина.

Authors:

Aminov R.F., PhD Student, Department of Physiology, Immunology and Biochemistry with a Course Civil Defense and Medicine, Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine;

Frolov A.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Physiology, Immunology and Biochemistry with a Course Civil Defense and Medicine, Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine;

Fedotov Ye.R., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology, Immunology and Biochemistry with a Course Civil Defense and Medicine, Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine.

Поступила в редакцию 26.03.2018
Отправлена на доработку 05.04.2019
Принята к печати 13.09.2019

Received 26.03.2018
Revision received 05.04.2019
Accepted 13.09.2019

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *BORRELIA BURGENDORFERI* SENSU LATO У КРОВОСОСУЩИХ КЛЕЩЕЙ В ПАРКОВЫХ ЗОНАХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Ю.А. Панферова¹, А.Н. Ваганова¹, О.А. Фрейлихман¹, К.А. Третьяков²,
С.Г. Медведев², А.О. Шапарь³, Н.К. Токаревич¹

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

² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора г. Санкт-Петербурга, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Бактериальные и вирусные инфекции, ассоциированные с клещами-переносчиками, широко распространены в умеренных широтах Северного полушария. Природные очаги инфекций данной группы совпадают с ареалами иксодовых клещей. Иксодовый клещевой боррелиоз является актуальной проблемой для ряда регионов России, в частности, Северо-Западного федерального округа и мегаполиса Санкт-Петербурга с прилегающими территориями Ленинградской области, где заражение людей может происходить при присасывании клеща в лесопарковых зонах, посещаемых с рекреационными целями горожанами. В настоящее время имеется лишь небольшое число публикаций по превалентности возбудителей инфекций, передаваемых с укусом клеща, на территории Санкт-Петербурга. На наличие ДНК патогенных боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* методом ПЦР были исследованы клещи, отловленные на флаг в парковой зоне мегаполиса (северное побережье Финского залива, Курортный район). Для положительных на присутствие ДНК боррелий образцов было проведено генотипирование с использованием видоспецифичных праймеров к фрагментам гена *rpoB*. Было установлено, что доминирующим видом иксодид на исследованной территории является таежный клещ *I. persulcatus*. Превалентность боррелий, относящихся к комплексу геномовидов *B. burgdorferi* s.l., составила 9,33%. Были обнаружены боррелии геномовидов *B. afzelii* и, реже, *B. garinii*. В одном образце выявлена микст-инфекция боррелиями двух видов. Интересным является тот факт, что все инфицированные бактериями клещи относились к виду *I. persulcatus*, что позволяет предположить, что возможна более тесная ассоциация патогена с данным видом переносчика. Полученные данные важны для изучения распространенности очагов боррелиоза в окрестностях Санкт-Петербурга, получения новых знаний по эпидемиологии данной инфекции и развития мер профилактики, диагностики и лечения. Стоит отметить, что частота инфицирования переносчиков боррелиями значительно выше, чем вирусом клещевого энцефалита, что обеспечивает более высокую заболеваемость. При сравнении наших данных с данными других европейских исследователей можно отметить тот факт, что превалентность боррелий в различных географических

Адрес для переписки:

Панферова Юлия Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: (812) 232-21-36 (служебн.).
Факс: (812) 233-20-92.
E-mail: ersvart@inbox.ru

Contacts:

Yulia A. Panferova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-21-36 (office).
Fax: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: ersvart@inbox.ru

Библиографическое описание:

Панферова Ю.А., Ваганова А.Н., Фрейлихман О.А., Третьяков К.А.,
Медведев С.Г., Шапарь А.О., Токаревич Н.К. Распространенность
генетических маркеров *Borrelia burgdorferi sensu lato* у кровососущих
клещей в парковых зонах Санкт-Петербурга // Инфекция и иммунитет.
2020. Т. 10, № 1. С. 175–179. doi: 10.15789/2220-7619-POB-806

Citation:

Panferova Yu.A., Vaganova A.N., Freylikhman O.A., Tretyakov K.A.,
Medvedev S.G., Shapar' A.O., Tokarevich N.K. Prevalence of *Borrelia*
burgdorferi sensu lato genetic markers in blood-sucking ticks in suburban
park zones in Saint Petersburg // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 175–179. doi: 10.15789/2220-
7619-POB-806

Исследование поддержано грантом сети Институтов Пастера ACIP-2010-08.

© Панферова Ю.А. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-POB-806>

регионах варьирует в широких пределах. Необходимо принять во внимание, что превалентность маркеров боррелий у почти 10% клещей, учитывая частую посещаемость исследованных территорий людьми, свидетельствует об опасности заражения боррелиозом в лесопарковых зонах Санкт-Петербурга.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, боррелии, геномовид, ПЦР, превалентность.

PREVALENCE OF *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO GENETIC MARKERS IN BLOOD-SUCKING TICKS IN SUBURBAN PARK ZONES IN SAINT PETERSBURG

Panferova Yu.A.^a, Vaganova A.N.^a, Freylikhman O.A.^a, Tretyakov K.A.^b, Medvedev S.G.^b, Shapar' A.O.^c, Tokarevich N.K.^a

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

^b Zoological Institute of RAS, St. Petersburg, Russian Federation

^c Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Tick-borne bacterial and viral infections are widespread in middle latitudes of the Northern hemisphere. Natural foci of such infections coincide with geographic areas inhabited by ixodid ticks. Ixodid tick-borne borreliosis is a pressing issue for some territories of Russia, especially for the North-Western Federal District and St. Petersburg megalopolis as well as adjacent areas of the Leningrad District, where people may become infected after tick bite in recreational zones in suburban park areas. Currently, very few publications regarding prevalence of tick-borne pathogens in St. Petersburg area are available. In our study, questing ticks flagged in park zone (northern coast of Finnish Gulf, Kurortny District) were examined with PCR for carriage of pathogenic *B. burgdorferi* sensu lato complex. In addition, samples positive for *Borrelia* DNA signal were further genotyped with species-specific primers against *rpoB* gene fragment. It was found that *Ixodes persulcatus* dominated in this area. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. complex comprised 9.33%. Genospecies *B. afzelii* and less frequently *B. garinii* were detected. A mixt-infection with two *Borrelia* species was detected in one sample. Interestingly, all *Borrelia*-infected ticks belonged to *I. persulcatus* suggesting a closer association for certain species in «pathogen-vector» system. Our findings are essential in investigating distribution of ixodid borreliosis foci in St. Petersburg and suburbs, obtaining new data regarding epidemiology, diagnostics, treatment and prevention of this infection. It is noteworthy than prevalence of pathogenic *Borrelia* spp. vs. tick-borne encephalitis virus in vectors was higher thereby accounting for its higher morbidity. Comparing our data with those published elsewhere by European researchers allows to note that prevalence of pathogenic *Borrelia* spp. in ticks varies broadly in diverse geographic regions. It is necessary to take into consideration that prevalence of *Borrelia* markers achieves ~10% in ticks given frequent attendance of park areas near St. Petersburg that point at risk of developing borreliosis in recreational zones.

Key words: ixodid tick-borne borreliosis, *Borrelia*, genospecies, PCR, prevalence.

Введение

В настоящее время иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) является самым распространенным заболеванием, ассоциированным с членистоногими переносчиками, в Северном полушарии. Значительно распространение данная инфекция имеет в умеренных широтах Евразии. На территории Европы вклад в распространение инфекции вносят спирохеты различных видов, входящих в комплекс *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) [6]. На территории Фенноскандии преобладают *B. afzelii* и *B. garinii* [7, 11], хотя в последние годы детектируются и другие виды боррелий [12]. Главными переносчиками патогенных боррелий на территории России являются таежный клещ *Ixodes persulcatus* и европейский лесной клещ *Ixodes ricinus*, имеющий также широкое распространение в странах Европы. Важным фактором в распространении боррелиоза, как и прочих инфекций, переносимых клещами, является

не только изменение климатических условий (преимущественно теплые зимы, способствующие увеличению численности клещей), но и возрастающая активность населения в посещении лесных угодий, где в основном происходит присасывание клещей. Очаги инфекций, переносимых клещами, могут формироваться как в естественных, так и в трансформированных человеком биоценозах. Таким образом, является актуальным исследование популяций клещей, обитающих в лесопарковых зонах крупных городов, на носительство патогенов, ассоциированных с данной группой переносчиков. Масштабные исследования на территории Санкт-Петербурга, являющегося эндемичной территорией по ИКБ, к настоящему моменту не проводились.

Целью настоящего исследования являлось изучение распространенности боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. и отдельных видов на территории лесопарковых зон мегаполиса Санкт-Петербурга, имеющих рекреационное значение.

Материалы и методы

Сбор голодных клещей проводился путем отлова на тканевый флаг с растительности. Сбор осуществляли на территории Курортного района Санкт-Петербурга (60°00' N, 30°03' E), заказника «Северное побережье Невской губы». Охраняемый статус данной территории придан в связи с наличием стоянок перелетных птиц на путях миграции на побережье Финского залива. Биоценоз в данных локациях был представлен смешанным лесом с преобладанием ели, сосны и мелколиственных древесных пород (береза, ольха черная), выраженным подлеском и распространенным травянистым покровом (цветковые растения и папоротники). Всего было отловлено на флаг 418 имаго голодных клещей при сборе клещей помещали в индивидуальные пробирки. Вид клещей определяли фенотипическим методом (Филиппова, 1977). Для определения инфицированности боррелиями клещей исследовали индивидуально. Перед исследованием клещей промывали однократно в 75% этаноле, высушивали на фильтровальной бумаге на воздухе при комнатной температуре. Каждого клеща индивидуально гомогенизировали в 100 мкл стерильного фосфатного буфера с помощью стальных стерильных шариков диаметром 5 мм на гомогенизаторе «FastPrep24» (MP Biomedicals, США) в следующем режиме: 2 раунда по 60 с, 6,0 м/с, перерыв 5 мин. Выделение ДНК из суспензии производили методом нуклеосорбции на силикагеле с применением набора «DNAprep 100» (Лаборатория Изоген, Москва, Россия), согласно инструкции производителя. Детекцию боррелий проводили с использованием праймеров, фланкирующих фрагмент гена *ospC*, F: AAAGAATACATTAAGTGCGATATT и R: GGGCTTGTAAGCTCTTTAACT [10]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5-кратный реакционный буфер «ScreenMix hot-start» (Евроген, Москва, Россия), содержащий солевой буфер, 200 мМ каждого дНТФ, 4 мМ MgCl₂, 2 единицы hot-start Taq-полимеразы, и 0,5 мкМ праймеров. Определение геновида боррелий проводили с помощью видоспецифичных праймеров к локусам гена *rpoB* по методу Lee S.H. [13]. Визуализацию результатов ПЦР проводили после электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия с использованием маркера молекулярного веса 100–1000 п.н.

Результаты и обсуждение

Из собранных на флаг 418 клещей 383 принадлежали к виду *I. persulcatus* (91,7%), 35 — *I. ricinus* (8,3%). Боррелии были обнаружены в 39 особях таежного клеща *I. persulcatus*, среди

I. ricinus патоген не был обнаружен. Вид боррелий был представлен в 29 случаях *B. afzelii* (74,36%), в 9 — *B. garinii* (23,08%). В одном случае была обнаружена микст-инфекция двумя видами (2,56%). Боррелии других видов комплекса *B. burgdorferi* s.l. не были обнаружены.

Общая степень инфицированности клещей патогенными боррелиями составила 9,33% (95% ДИ 6,6–12,1%). Превалентность боррелий у таежного клеща составила 10,18% (ДИ 95% 7,2–13,2%). Отсутствие боррелий в особях лесного клеща может быть связано с невысокой численностью данного вида на обследованной территории, по сравнению с таежным клещом, вследствие чего выборка переносчика была небольшой. Следует также учитывать тот факт, что в странах Северной Европы выявлялась более высокая инфицированность таежного клеща боррелиями в зонах симпатрии, что может быть связано со спецификой взаимоотношения «патоген–вектор» [12]. Полученные данные о более частом инфицировании боррелиями таежного клеща согласуются с данными ряда других исследователей, полученными на территории России [2].

ДНК-маркеры видов *B. afzelii* и *B. garinii* выявляли с частотой 6,94% (ДИ 95% 4,5–9,4%) и 2,15% (ДИ 95% 0,8–3,5%), что согласуется с данными других исследований в Северной Евразии (на территории России и Финляндии) [2, 3, 8]. Частота микст-инфекции двумя видами составила 0,24% (ДИ 95% 0,02–0,7%). Учитывая преимущественную ассоциацию видов патогенных боррелий с прокормителями разных классов позвоночных, было установлено, что в исследованных локациях на побережье Финского залива прокормителями иксодовых клещей могут являться не только наземные млекопитающие, с которыми ассоциированы *B. afzelii*, но и птицы, являющиеся более частыми хозяевами *B. garinii*. Ранее на территории Финляндии была выявлена преимущественная ассоциация боррелий вида *B. garinii* с таежными клещами по сравнению с европейским лесным клещом [12]. В нашем исследовании установлена преимущественная циркуляция вида *B. afzelii* в клещах при сборе с растительности в наземных станциях. В то же время, присутствие клещей *I. ricinus*, преобладающих по распространенности на более западных территориях Курортного района Санкт-Петербурга может отмечаться как свидетельство симпатрии двух видов иксодид в наземных экосистемах в месте сбора, так и наблюдаться в связи с заносом предимагинальных стадий европейского лесного клеща с прокормителями-птицами, однако это предположение требует более детального исследования.

Спорным моментом является вопрос о персистенции генетических маркеров патогенов

в клещах и истинные уровни бактерионосительства. С одной стороны, длительная циркуляция свободной ДНК в организме переносчика маловероятна, с другой стороны, ряд исследователей указывает на то, что высокая чувствительность метода ПЦР позволяет выявлять присутствие нежизнеспособных бактериальных клеток, что не является истинной превалентностью. Применяется бактериологическое исследование на присутствие боррелий, однако методы темнопольной микроскопии и посева на среды не являются столь же высокочувствительными, как амплификационные методы детекции [15]. Ранее была описана трансвариальная и трансстадийная передача некоторых видов боррелий у разных клещей-переносчиков, включая таежного и европейского лесного клеща, с разной частотой в различных моделях [1, 9, 14, 18]. Стоит отметить, что европейские исследователи в большинстве случаев приравнивают показатели обнаружения ДНК патогенов, передаваемых с укусом клеща, у переносчиков к их реальной превалентности [11, 12].

Выявленная нами распространенность генетических маркеров боррелий в иксодидях является относительно невысокой по сравнению с данными других исследователей [11, 17], однако соотносится с показателем инфицированности клещей боррелиями в некоторых других мегаполисах Восточной Европы [16]. Наблюдаемый уровень инфицированности переносчиков свидетельствует о достаточно высоком риске заражения ИКБ при присасывании клеща в лесопарковых зонах на северном побережье Финского залива, активно посещаемых жителями Санкт-Петербурга с рекреационными целями.

Количество пострадавших от укусов клещей в Курортном районе Санкт-Петербурга за период 2013–2016 гг. в среднем составляла 154 человека в год, в отдельные годы достигая максимума — 245 человек. Средняя заболеваемость ИКБ на территории Курортного района Санкт-Петербурга за 2013–2016 гг. составляла 101 случай на 100 тыс. населения. Несмотря на относительно невысокую, по сравнению с количеством пострадавших от укусов, заболеваемость жителей района болезнью Лайма, можно утверждать, что на территории Курортного района присутствуют очаги ИКБ и что циркуляция боррелий в иксодовых клещах в лесопарках на территории города создает потенциальную опасность заражения. Уровень инфицированности патогенными боррелиями клещей, снятых с людей, на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области, выявленный нами ранее, незначительно отличался от аналогичного, установленного в данном исследовании при исследовании голодных клещей [4].

В результате исследования установлена превалентность патогенных боррелий у иксодид в лесопарковых зонах мегаполиса Санкт-Петербурга. Выявлена циркуляция двух видов комплекса *B. burgdorferi* s.l., причем возможна микст-инфекция переносчика боррелиями двух видов. Обитающие в рекреационных зонах клещи *I. persulcatus* могут представлять опасность для здоровья горожан. Мониторинг за зараженностью клещей в биотопах является важным для прогнозирования эпидемиологической ситуации по болезни Лайма на территории мегаполиса и совершенствованию профилактики этой и других инфекций, передаваемых с укусом клеща.

Список литературы/References

1. Балашов Ю.С., Григорьева Л.А., Оливер Дж.Х. Локализация боррелий в организме клеща *Ixodes persulcatus* на разных стадиях развития // Паразитология. 1997. Т. 31, № 2. С. 97–103. [Balashov Yu.S., Grigoryeva L.A., Oliver J.H. Location of borreliae in different stages of the tick *Ixodes persulcatus*. *Parazitologiya*, 1997, vol. 31, no. 2, pp. 97–103. (In Russ.)]
2. Коротков Ю.С., Кисленко Г.С., Буренкова Л.А., Рудникова Н.А., Карань Л.С. Пространственная и временная изменчивость зараженности клещей *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* возбудителем болезни Лайма в Московской области // Паразитология. 2008. Т. 42, № 6. С. 441–451. [Korotkov Yu.S., Kislenco G.S., Burenkova L.A., Rudnikova N.A., Karan L.S. Spatial and temporal variability of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* infection with the Lyme disease agent in Moscow region. *Parazitologiya*, 2008, vol. 42, no. 6, pp. 441–451. (In Russ.)]
3. Москвитина Н.С., Коробицын И.Г., Тютеньков О.Ю., Гашков С.И., Кононова Ю.В., Москвитин С.С., Романенко В.Н., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Тупота Н.Л., Семенцова А.О., Терновой В.А., Локтев В.Б. Участие птиц в поддержании клещевых инфекций в Томском антропогенном очаге // Известия Российской Академии наук. Серия биологическая. 2014. № 4. С. 408–414. [Moskvitina N.S., Korobitsyn I.G., Tyuten'kov O.Yu., Gashkov S.I., Kononova Yu.V., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Kartashov M.Yu., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. The role of birds in the maintenance of tick-borne infections in the Tomsk anthropogenic foci. *Izvestiya Rossiyskoy Akademii nauk. Seriya biologicheskaya* = *Biology Bulletin (Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk)*, 2014, vol. 4, pp. 408–414. doi: 10.7868/S0002332914040092 (In Russ.)]
4. Панферова Ю.А., Суворова М.А., Шапарь А.О., Токаревич Н.К. Бактериальные и вирусные патогены в клещах *Ixodes* sp. на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 219–222. [Panferova Yu.A., Suvorova M.A., Shapar' A.O., Tokarevich N.K. Bacterial and viral pathogens in *Ixodes* sp. ticks in St. Petersburg and Leningrad district. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 219–222. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-219-222 (In Russ.)]

5. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae. Л.: Наука. Ленингр. отделение, 1977. 393 с. [Filippova N.A. Ixodid ticks subfamily Ixodinae. Leningrad: Nauka, Leningrad Branch, 1977. 393 p. (In Russ.)]
6. Hubalek Z., Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol. Res.*, 1998, vol. 84, pp. 167–172.
7. Junttila J., Tanskanen R., Tuomi J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in selected tick populations in Finland. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1994, vol. 26, pp. 349–355
8. Junttila J., Peltomaa M., Soini H., Marjamaki M., Viljanen M. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas in Helsinki. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, pp. 1361–1365.
9. Kalmar Z., Cozma V., Sprong H., Jahfari S., D'Amico G., Marcutan D., Ionica A., Magdas C., Modry D., Mihalca A. Transstadial transmission of *Borrelia turcica* in *Hyalomma aegyptium* ticks. *PLoS One*, 2015, vol. 10: e0115520. doi: 10.1371/journal.pone.0115520
10. Kim C., Yi Y., Yu D., Lee M., Ccho M., Desai A., Shringi S., Klein T.A., Kim H.C., Song J.W., Baek L.J., Chong S.T., O'Guinn M.L., Lee J.S., Lee I.Y., Park J.H., Foley J., Chae J.S. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 9, pp. 5766–5776. doi: 10.1128/AEM.00431-06
11. Kjelland V., Stuen S., Skarpaas T., Slettan A. Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2010, vol. 42, pp. 579–585. doi: 10.3109/00365541003716526
12. Laaksonen M., Klemola T., Feuth E., Sormunen J., Puisto A., Makela S., Penttinen R., Ruohomaki K., Hanninen J., Saaksjarvi I., Sprong H., Hytonen J., Vesterinen E. Tick-borne pathogens in Finland: comparison of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* in sympatric and parapatric areas. *Parasites Vectors*, 2018, vol. 11: 556. doi: 10.1186/s13071-018-3131-y
13. Lee S.H., Kim B.J., Kim J.H., Park K.H., Kim S.J., Kook Y.H. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (rpoB) sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, pp. 2557–2562.
14. Nefedova V., Korenberg E., Gorelova N., Kovalevskii Yu. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol.*, 2004, vol. 51. pp. 67–71.
15. Noda A., Rodriguez I., Mondeja B., Fernandez C. Design, optimization and evaluation of a polymerase chain reaction for detection of *Borrelia* spp. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2013, vol. 22, pp. 639–653.
16. Rogovskyy A., Batool M., Gilis D., Holman P., Nebogatkin I., Rogovska Yu., Rogovskyy M. Diversity of *Borrelia* spirochetes and other zoonotic agents in ticks from Kyiv, Ukraine. *Ticks Tick-borne Dis.*, 2018, vol. 9, pp. 404–409. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.12.006
17. Sormunen J., Penttinen R., Klemola T., Hanninen J., Vuorinen I., Laaksonen M., Saaksjarvi I., Ruohomaki K., Vesterinen E. Tick-borne bacterial pathogen in southwestern Finland. *Parasit. Vectors*, 2016, vol. 9, pp. 168. doi: 10.1186/s13071-016-1449-x
18. Toutoungi L.N., Gern L. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Exp. Appl. Acarol.*, 1993, vol. 17, pp. 581–586.

Авторы:

Панферова Ю.А., младший научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Ваганова А.Н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. 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;
Третьяков К.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории паразитологии Зоологического института РАН, Санкт-Петербург, Россия;
Медведев С.Г., д.б.н., зав. лабораторией паразитологии Зоологического института РАН, Санкт-Петербург, Россия;
Шапарь А.О., зав. отделом паразитологии Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора г. Санкт-Петербурга, Санкт-Петербург, Россия;
Токаревич Н.К., д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Panferova Yu.A., Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Vaganova A.N., Researcher, Laboratory of Biomolecular Technologies, Department of New Technologies, 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;
Tretyakov K.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Parasitology, Zoological Institute of RAS, St. Petersburg, Russian Federation;
Medvedev S.G., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory of Parasitology, Zoological Institute of RAS, St. Petersburg, Russian Federation;
Shapar A.O., Head of Parasitological Department, Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance, St. Petersburg, Russian Federation;
Tokarevich N.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Epidemiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.11.2018
 Отправлена на доработку 06.04.2019
 Принята к печати 05.06.2019

Received 23.11.2018
 Revision received 06.04.2019
 Accepted 05.06.2019

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЛЕКТИНОВОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА (МАННОЗОСВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА И ФИКОЛИНА) КАК ФАКТОР РИСКА ХРОНИЧЕСКОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ CagA ШТАММОМ БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI* У ПОДРОСТКОВ

С.Ю. Терещенко¹, М.В. Смольникова¹, С.Н. Зобова^{1,2}

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН) — обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» (НИИ МПС), г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

Резюме. В настоящее время нет полной информации об особенностях иммунного реагирования организма-хозяина направленных против *Helicobacter pylori* (Hр), как в отношении формирования хронического носительства после первичного инфицирования, так и в отношении роли нарушений иммунного и воспалительного ответа в механизмах формирования эрозивно-язвенных поражений. Известно несколько молекул, способных активировать лектиновый путь активации комплемента: фиколины человека и маннозосвязывающий лектин (mannose-binding lectin, MBL). Значительная часть человеческой популяции имеет врожденно низкий уровень продукции и/или низкую функциональную активность MBL и фиколина вследствие носительства различных вариантов гена MBL2, что потенциально увеличивает предрасположенность к более тяжелому течению самых разнообразных инфекционных заболеваний. Было показано, что полиморфизмы гена MBL2 ассоциированы с более тяжелым (Hр)-ассоциированным атрофическим гастритом и раком желудка. Влияние полиморфизмов генов MBL2 и FNC2 (L-фиколин) на Hр-инфицированность в Российских популяциях в достаточной мере не изучено. У 93 подростков-европеоидов в возрасте 12–17 лет, направленных на обследование в гастроэнтерологическое отделение клиники НИИ медицинских проблем Севера (г. Красноярск) проведено тестирование на наличие антител против CagA антигена Hр в плазме. В качестве дополнительного контроля была использована популяционная выборка 203 новорожденных-европеоидов, родившихся в г. Красноярске.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В., Зобова С.Н. Полиморфизм генов лектинового пути активации комплемента (маннозосвязывающего лектина и фиколина) как фактор риска хронического инфицирования высокопатогенным CagA штаммом бактерии *Helicobacter pylori* у подростков // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 180–186. doi: 10.15789/2220-7619-CAL-660

Citation:

Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V., Zobova S.N., Complement activation lectin pathway (mannose-binding lectin and ficolin) genes polymorphism as the risk factor of CagA positive chronic *Helicobacter pylori* infection in adolescents // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 180–186. doi: 10.15789/2220-7619-CAL-660

Генотипирование аллельных вариантов генов MBL2 и FCN2 осуществлено методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) специфических участков генома. Было исследовано четыре полиморфных участка: rs11800451 и rs1800450 (MBL2), rs17549193 и rs7851696 (FCN2). Носительство редкого аллеля В полиморфного участка rs1800450 MBL2 и гомозиготы по редкому аллелю Т полиморфного участка rs17549193 FCN2 ассоциированы с повышенным риском носительства высокопатогенного CagA штамма бактерии Hp (OR = 2,36 (1,03–5,4), p = 0,04 и OR = 5,69 (1,08–29,99), p = 0,04, соответственно). По литературным данным указанные редкие генетические варианты ассоциированы с низкой плазменной концентрацией и/или низкой функциональной активностью маннозосвязывающего лектина и L-фиколина. Распространенность указанных генетических вариантов в изученной популяционной выборке новорожденных имело промежуточный характер, что дополнительно подтверждает европеоидную принадлежность выборок и несмещенный характер включения в основные тестируемые группы. Мы предполагаем, что врожденные дефициты MBL и L-фиколина связаны с более высоким риском инфицирования CagA позитивными штаммами *Helicobacter pylori* у подростков, что может быть обусловлено нарушениями лектин-опосредованной активации комплемента и опсонизации, что особенно характерно для CagA-положительных штаммов бактерий.

Ключевые слова: полиморфизм генов, маннозосвязывающий лектин, фиколин, CagA штамм, *Helicobacter pylori*, подростки.

COMPLEMENT ACTIVATION LECTIN PATHWAY (MANNOSE-BINDING LECTIN AND FICOLIN) GENES POLYMORPHISM AS THE RISK FACTOR OF CagA POSITIVE CHRONIC HELICOBACTER PYLORI INFECTION IN ADOLESCENTS

Tereshchenko S.Yu.^a, Smolnikova M.V.^a, Zobova S.N.^{a,b}

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

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

Abstract. Currently, features of the host immune response against *Helicobacter pylori* (Hp) both regarding establishment of chronic carriage after primary infection as well as a role of impaired immune and inflammatory response in the mechanisms of developing erosive-ulcerative lesions remain poorly investigated. Only few molecules are known to activate the complement activation lectin pathway including human ficolins and mannose-binding lectin (MBL). A substantial part of the human population bears an intrinsically low MBL and ficolin production level and/or low functional activity due to the carriage of various MBL2 genetic variants potentially elevating susceptibility to a more severe course of a wide range of infectious diseases. It has been shown that the MBL2 gene polymorphisms are associated with a risk of developing in Hp-infected patients more severe gastric mucosal atrophy and gastric cancer risk. An impact of the MBL2 and L-ficolin (FNC2) gene variants on Hp infection rate in Russia has not yet been examined in full detail. In our study we enrolled 93 Caucasian adolescents (aged 12–17, Krasnoyarsk, Siberia, Russia) to test for serum anti-Hp-CagA antibodies. Additionally, 203 newborn dried blood spot specimens born in Krasnoyarsk, Russia, were used as a population control sample. Genotyping of allelic MBL2 and FCN2 gene variants was performed by using RFLP approach to examine the following polymorphic regions: rs11800451 and rs1800450 (MBL2), rs17549193 and rs7851696 (FCN2). Carriage of the rare allele in the polymorphic region rs1800450 of the MBL2 gene and the homozygous for the rare allele T of polymorphism rs17549193 in FCN2 gene was associated with an increased risk of CagA seropositivity (OR = 2.36 (1.03–5.4), p = 0.04 and OR = 5.69 (1.08–29.99), p = 0.04, respectively) shown before to be associated with low plasma concentrations and/or low functional activity of mannose-binding lectin and L-ficolin. In contrast, such genetic variants in the newborn population cohort had an intermediate prevalence further confirming the Caucasoid identity of the samples and an unbiased inclusion of subjects in the main test groups. Thus, we suggest that the primary MBL and L-ficolin deficiencies are associated with a higher risk of CagA positive *Helicobacter pylori* chronic infection in adolescents seemingly accounted for by alterations in lectin-mediated complement activation and opsonization especially in case of CagA positive bacterial strains.

Key words: genes polymorphism, mannose-binding lectin, ficolin, CagA, *Helicobacter pylori*, adolescents.

Хроническое инфицирование бактерией *Helicobacter pylori* (Hp) в настоящее время общепризнанно является ведущим этиологическим фактором формирования атрофического гастрита и эрозивно-язвенных поражений желудка и 12-перстной кишки. Распространенность бессимптомного Hp-инфицирования среди подростков городского населения Российской

Федерации очень высока и составляет, например, не менее 50%, согласно данным нашего недавнего исследования для г. Красноярск [1]. В то же время, эрозивно-язвенные поражения развиваются лишь у небольшой части подростков (не более 1–2% подростковой популяции). Таким образом, логичным будет выглядеть предположение о наличии неких предраспола-

гающих факторов, как со стороны патогена, так и со стороны организма-хозяина, приводящих к запуску процесса язвообразования в слизистой желудка и 12-перстной кишки. Наличие одного из таких факторов со стороны бактерии было подтверждено нами в изучаемой популяции: было показано, что большую патогенетическую роль в формировании эрозий и язв антрального отдела желудка и/или 12-перстной кишки у детей г. Красноярска играет не сам факт инфицированности Нр, а носительство патогенного CagA штамма бактерии [1]. Данная находка согласуется с многочисленными литературными данными о связи носительства CagA штамма Нр, также как и homB, vacAs1a/m1 и iceA1 штаммов, с механизмами изъязвления слизистой желудка и 12-перстной кишки.

Меньше в настоящее время известно об особенностях иммунного реагирования организма-хозяина направленных против Нр, как в отношении формирования хронического носительства после первичного инфицирования, так и в отношении роли нарушений иммунного и воспалительного ответа в механизмах формирования эрозивно-язвенных поражений. Так, описаны врожденные дефекты адаптивного иммунитета в виде предрасположенности к гиперпродукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 и TNF α в механизмах большей подверженности к Нр-инфицированности и формированию Нр-ассоциированных заболеваний [10, 11].

К настоящему времени описано несколько дефектов системы врожденного иммунитета, ассоциированных с хроническим Нр-инфицированием и агрессивным течением Нр-индуцированного воспалительного процесса. В частности, в этой связи описаны дефекты функционирования Toll-like рецепторов второго и четвертого типов, а также модуляторов системы Toll-like рецепторов — myeloid differentiation factor 88 (MYD88) и nuclear factor- κ B essential modulator (NEMO). Недавно также были идентифицированы врожденные дефекты NOD-рецепторов, CD14 и протеина CARD8 [4].

Кроме того, активное внимание исследователей привлекли также дефекты в системе лектинового пути активации комплемента, вероятно, способствующие хронизации Нр-инфицирования и усилению ответной воспалительной реакции в слизистой желудка и 12-перстной кишки. Лектины — общий термин протеинов, способных к распознаванию и агрегации молекул олиго- и полисахаридной природы. Среди всех лектинов уникальными функциями формирования комплексов с углеводными компонентами микробной стенки и, одновременно, со специфическими протеазами обладают собственно MBL и фиколины.

Образование сложного комплекса приводит, в итоге, к активации системы комплемента. Маннозосвязывающий лектин (Mannose-binding lectin, MBL) — паттерн-распознающий острофазовый белок, относящийся к системе врожденного иммунитета и активно участвующий в элиминации широкого круга патогенных микроорганизмов посредством активации лектинового пути системы комплемента и опсонизации. Значительная часть человеческой популяции имеет врожденно низкий уровень продукции и/или низкую функциональную активность MBL и фиколина вследствие носительства различных вариантов гена MBL2, что потенциально увеличивает предрасположенность к более тяжелому течению самых разнообразных инфекционных заболеваний.

Так, японскими исследователями было показано, что В аллель полиморфного участка rs1800450 гена маннозосвязывающего лектина (MBL2) ассоциирован с развитием выраженной атрофии слизистой, обусловленной персистенцией бактерий *Helicobacter pylori* [14]. В то же время, в этом исследовании не было найдено связи полиморфизма rs1800450 ни с самим фактом Нр-инфицирования, ни с развитием эрозий и язв. Ранее была продемонстрирована способность маннозосвязывающего лектина (MBL) фиксироваться на липополисахаридных компонентах оболочки Нр и активировать комплемент [7]. Была установлена повышенная экспрессия гена MBL2 в клетках слизистой желудка при Нр-ассоциированном гастрите у детей [3], а также ассоциация определенных гаплотипов гена MBL2 с предрасположенностью к формированию хронической Нр-инфицированности и риском развития рака желудка [2, 13, 15].

Данные о подобных связях среди европеоидов России до настоящего времени в доступной нам литературе не описаны.

Материалы и методы

У 93 подростков-европеоидов в возрасте 12–17 лет, направленных на обследование в гастроэнтерологическое отделение клиники НИИ медицинских проблем Севера (г. Красноярск) в связи с рецидивирующей абдоминальной болью, были проведены сбор анамнеза, общеклинические методы обследования и фиброгастроскопия, после чего было сформировано две клинических группы — в первую вошли подростки с эрозивно-язвенным поражением желудка и/или 12-перстной кишки на момент обследования или в анамнезе (41 пациент), вторую составили подростки без эрозивно-язвенных поражений с диагностированными функциональными заболеваниями желудочно-кишечного тракта (57 пациентов). Всем подросткам было прове-

дено тестирование на наличие антигена бактерии *Helicobacter pylori* в кале иммуноферментным методом с использованием специфических моноклональных антител (Immundiagnostik, Германия), а также тестирование на наличие антител против СаgА антигена *Helicobacter pylori* иммуноферментным методом (Вектор-Бест, Россия) и генотипирование аллельных вариантов генов MBL2 и FCN2. В качестве дополнительного контроля была использована популяционная выборка новорожденных-европеоидов, родившихся в г. Красноярске: ДНК была выделена из 203 проб сухой капли крови (использован банк КГУЗ «Красноярский краевой консультативно-диагностический центр медицинской генетики»).

Выделение ДНК проведено с использованием набора «DIAtomDNAprep» (Изоген, Россия). Генотипирование аллельных вариантов генов MBL2 и FCN2 осуществлено методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) специфических участков генома. Амплификация фрагмента ДНК генов проводилась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими олигонуклеотидными праймерами, фланкирующими участок гена, содержащий полиморфизм. Гидролиз полученного фрагмента ДНК осуществлен с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции. Исследуемые мутации в гене MBL2: codon 57 (rs11800451), codon 54 (rs1800450), находятся в 1 экзоне и амплифицировались с использованием пары праймеров 5'-TAGGACAGAGGGCATGCTC-3' и 5'-CAGGCAGTTTCTCTGGAAGG-3', температура отжига составляла 60°C, амплифицируемый фрагмент составлял 349 пар оснований. Для гидролиза использовались эндонуклеазы рестрикции MboII (rs11800451) и AccBI I (rs1800450). Мутации в гене FCN2: +6359C>T (rs17549193), (p.T236M); +6424G>T (rs7851696), (p.A258S) находятся в 8 экзоне и амплифицировались с использованием пары праймеров 5'-CTGCCTGTAACGATGCTCAC-3' и 5'-ATCCTTCCCCGACTTCCAG-3', температура отжига составляла 60°C, амплифицируемый фрагмент составлял 237 пар оснований. Для гидролиза использовались эндонуклеазы рестрикции HpySE526 I (rs17549193) и MroXI (rs7851696). Далее проводилось электрофоретическое разделение продуктов рестрикции и визуализация генотипов в ультрафиолетовом свете.

Ассоциацию между заболеванием/Нр-статусом и генотипом определяли с помощью критерия χ^2 , сравнивая распределение генотипов и аллелей по каждому полиморфизму между группами пациентов и популяционной выборкой новорожденных. В связи со значительной неоднородностью анализируемых групп

по возрасту (подростки/новорожденные) перед сравнением проводили анализ соответствия выборок равновесию Харди–Вайнберга. Если распределение частот генотипов хотя бы в одной из сравниваемых групп демонстрировало отклонение от закона Харди–Вайнберга ($p < 0,1$) для анализа использовали общую модель наследования (тест хи-квадрат, $df = 2$), при соблюдении закона в обеих сравниваемых выборках использовали мультипликативную модель наследования (тест хи-квадрат, $df = 1$). Показатели «отношения шансов» (OR-odds ratio) с 95% доверительным интервалом рассчитывали с помощью on-line калькулятора (<http://gen-exp.ru>).

Результаты и обсуждение

Ген MBL2, расположенный в хромосомном участке 10q11.2, кодирует продукцию маннозсвязывающего лектина. Известно несколько однонуклеотидных полиморфизмов, как в промоторном, так и в кодирующем регионах гена MBL2, которые влияют на экспрессию и функциональную активность протеина. В этой связи наиболее исследованы три полиморфных кодона 1 экзона гена MBL2: 52 (rs5030737), 54 (rs1800450) и 57 (rs1800451), варианты аллели которых обозначаются как D, B и C, соответственно, а дикий аллель — A. Наличие любого из этих трех вариантов аллелей обозначается как O-аллель и приводит к одинаковому результату — экспрессии нестабильного и функционально дефектного MBL, что проявляется его низкой плазменной концентрацией и редуцированной способностью активировать компонент [9].

В настоящее время предполагается, что для мутации rs17549193 наличие вариантного аллеля T (генотипы СТ и ТТ) сопряжено с низкой авидностью фиколина к патогенам. Противоположная ситуация наблюдается с мутацией rs7851696, где, по всей вероятности, с низкой авидностью сопряжен нормальный (дикий) вариант гена FCN2 (генотип GG). Например, было показано, что генетические полиморфизмы в 8 экзоне гена FCN2, приводящие к аминокислотной замене аланина на серин (p.A258S, мутация +6424G>T) повышают способность фиколина прикрепляться к углеводным компонентам бактерий, а тирозина на метионин (p.T236M, мутация +6359C>T) снижают такую способность [5].

Нами были изучены распределения генотипов 54 (rs1800450) и 57 (rs1800451) кодонов гена MBL2 и распределения генотипов по мутациям rs17549193 и rs7851696 гена FCN2 в выделенных клинических группах подростков и у новорожденных г. Красноярска.

Вариантный аллель полиморфного участка rs1800451 гена MBL2 был выявлен только в одном случае среди всех обследованных: у одного новорожденного в популяции г. Красноярск был выявлен генотип CC, во всех остальных образцах ДНК был установлен генотип AA. Согласно имеющимся у нас данным литературного поиска, крайне редкая встречаемость аллеля C в 57 кодоне гена MBL2 впервые на эпидемиологическом уровне описана нами в настоящем исследовании для европеоидов Центральной Сибири. Ранее редкая встречаемость мутации в 57 кодоне гена MBL2 была показана для кавказоидных, но не для африканоидных популяций [8].

Распределение MBL2 (мутация rs1800450) и FCN2 (мутации rs17549193 rs7851696) генотипов у подростков г. Красноярск с наличием и отсутствием антител против CagA штамма бактерии Hp, а также в популяционной выборке новорожденных-европеоидов г. Красноярск представлены в таблице.

Из полученных нами данных следует, что носительство редкого аллеля В полиморфного

участка rs1800450 гена MBL2 и гомозиготного состояния по редкому аллелю Т полиморфного участка rs17549193 гена FCN2 ассоциированы с повышенным риском носительства высокопатогенного CagA штамма бактерии Hp (OR = 2.36 (1.03–5.4), p = 0.04 и OR = 5.69 (1.08–29.99), p = 0.04, соответственно). Распространенность указанных генетических вариантов в популяционной выборке новорожденных имело промежуточный характер, что дополнительно подтверждает европеоидную принадлежность выборок и несмещенный характер включения в основные тестируемые группы.

Выше было показано, что согласно литературным данным указанные редкие генетические варианты ассоциированы с низкой плазменной концентрацией и/или низкой функциональной активностью маннозосвязывающего лектина и L-фиколина. Таким можно констатировать, что врожденные нарушения лектинового пути активации комплемента являются фактором риска хронического инфицирования высокопатогенным CagA штаммом бактерии Hp и фор-

Таблица. Распределение MBL2 и FCN2 генотипов у подростков г. Красноярск с наличием и отсутствием антител против CagA штамма *Helicobacter pylori*, а также в популяционной выборке новорожденных-европеоидов г. Красноярск, абс. (%)

Table. Distribution of MBL2 and FCN2 genotypes in adolescents with/without *Helicobacter pylori* CagA strain-specific antibodies residing in Krasnoyarsk compared to Caucasian newborn population control sample, abs. (%)

MBL2 и FCN2 генотипы MBL2 and FCN2 genotypes		Подростки с наличием Anti-CagA Anti-CagA+ adolescents (n = 35)	Подростки без наличия Anti-CagA Anti-CagA- adolescents (n = 58)	Новорожденные Newborns (n = 203)	OR, p*
		1	2	3	
MBL2 rs1800450	AA	21 (60,0%)	46 (79,3%)	145 (71,8%)	OR1–2 = 2,36 (1,03–5,4), p = 0,04 Рассчитано для аллеля В, мультипликативная модель наследования, тест хи-квадрат, df = 1 Calculated for allele В, multiplicative model of inheritance, chi-square test, df = 1 OR2–3 = 14,58 (0,87–244,18), p = 0,03 Рассчитано для генотипа ВВ, общая модель наследования, тест хи-квадрат, df = 2 Calculated for the ВВ genotype, general inheritance model, chi-square test, df = 2
	AB	13 (37,1%)	12 (20,7%)	35 (17,3%)	
	BB	1 (2,9%)	0 (0%)	22 (10,9%)	
	В**	0,214	0,103	0,196	
FCN2 rs17549193	CC	18 (51,4%)	26 (45,6%)	72 (35,4%)	OR1–2 = 5,69 (1,08–29,99), p = 0,04 Рассчитано для генотипа ТТ, общая модель наследования, тест хи-квадрат, df = 2 Calculated for the ТТ genotype, general inheritance model, chi-square test, df = 2
	CT	11 (31,4%)	29 (50,9%)	112 (55,2%)	
	TT	6 (17,2%)	2 (3,5%)	19 (9,4%)	
	Т**	0,329	0,289	0,369	
FCN2 rs7851696	GG	32 (91,4%)	46 (80,7%)	174 (85,7%)	
	GT	2 (5,7%)	11 (19,3%)	27 (13,3%)	
	TT	1 (2,9%)	0 (0%)	2 (1,0%)	
	Т**	0,057	0,096	0,076	

Примечание. *Представлены только данные с p ≤ 0,05; **в строке представлены частоты вариантных аллелей в обследованных группах.
Note. *The data with significance set at p ≤ 0.05 are solely presented; **frequency of variant alleles in the examined groups is shown.

мирования эрозивно-язвенных поражений желудка и 12-перстной кишки у подростков.

Наши данные согласуются с исследованием ассоциации генетических маркеров врожденного нарушения лектинового пути активации комплемента с предрасположенностью к формированию хронической Нр-инфицированности, к более агрессивному течению Нр-индуцированного воспаления слизистой и риском развития рака желудка [3, 13–15]. Кроме того, недавнее исследование E. Mortazavi et al. продемонстрировало сходные с нашими результаты: MBL2 rs1800450 ВВ генотип в 4 раза повышал риск инфицирования CagA штаммом бактерии Нр у пациентов с диабетом II типа [12].

Возможными механизмами вовлечения выявленных нами врожденных нарушений лектинового пути активации комплемента в сложный патогенез формирования эрозивно-язвенных поражений желудка и 12-перстной кишки могут быть:

1. нарушение процессов опсонизации и фагоцитоза бактерии Нр, способствующих переходу первичного инфицирования в хроническую персистенцию. По всей вероятности, такое нарушение в большей степени характерно для случаев инфицирования CagA штаммом бактерии;

2. имеющиеся доказательства возможности интрацеллюлярной персистенции Нр в клетках слизистой желудка позволяет предположить участие лектин-ассоциированного фагоцитоза в механизмах клиренса инфицированных клеток [3, 6]. Соответственно, нарушение указанного процесса санации может приводить

к интраслизистой диссеминации бактерии и усилению воспалительного процесса;

3. снижение функциональной активности лектинового пути активации комплемента может модифицировать про- и противовоспалительные механизмы, опосредованные другими иммунными (TLR2, MYD88, NEMO, цитокиновый ответ) и неиммунными механизмами;

4. неэффективный/незавершенный лектин-ассоциированный фагоцитоз экстрацеллюлярных бактерий и инфицированных клеток может приводить к избыточному рекрутингу нейтрофилов в очаг воспаления, что приводит к более выраженному воспалительному процессу, атрофии/деструкции тканей и формированию эрозий и язв слизистой.

Выводы

1. Носительство редкого аллеля В полиморфного участка rs1800450 гена MBL2 и гомозиготного состояния по редкому аллелю Т полиморфного участка rs17549193 гена FCN2 ассоциированы с повышенным риском хронической инфицированности высокопатогенным CagA штаммом бактерии Нр (OR = 2,36 (1,03–5,4), p = 0,04 и OR = 5,69 (1,08–29,99), p = 0,04, соответственно).

2. Врожденные нарушения лектинового пути активации комплемента могут являться дополнительным фактором риска хронического инфицирования высокопатогенным CagA штаммом бактерии Нр и формирования эрозивно-язвенных поражений желудка и 12-перстной кишки у подростков.

Список литературы/References

1. Терещенко С.Ю., Каспаров Э.В., Прахин Е.И., Анисимова Е.Н., Шубина М.В., Горбачева Н.Н. Инфицированность бактерией *Helicobacter pylori* у подростков г. Красноярск с функциональными заболеваниями желудочно-кишечного тракта // Вопросы детской диетологии. 2017. Т. 15, № 5. С. 5–21. [Tereshchenko S.Yu., Kasparov E.V., Prakhin E.I., Anisimova E.N., Shubina M.V., Gorbacheva N.N. Infection with the bacterium *Helicobacter pylori* in adolescents in Krasnoyarsk with functional diseases of the gastrointestinal tract. *Voprosy detskoy dietologii = Pediatric Nutrition*, 2017, vol. 15, no. 5, pp. 5–21. doi: 10.20953/1727-5784-2017-5-15-21 (In Russ.).]
2. Baccarelli A., Hou L., Chen J., Lissowska J., El-Omar E.M., Grillo P., Giacomini S.M., Yaeger M., Bernig T., Zatonski W., Fraumeni J.F. Jr., Chanock S.J., Chow W.H. Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk. *Int. J. Cancer*, 2006, vol. 119, no. 8, pp. 1970–1975. doi: 10.1002/ijc.22075
3. Bak-Romaniszyn L., Cedzynski M., Szemraj J., St Swierzko A., Zeman K., Kaluzynski A., Planeta-Malecka I. Mannan-binding lectin in children with chronic gastritis. *Scand. J. Immunol.*, 2006, vol. 63, no. 2, pp. 131–135. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01719.x
4. Chmiela M., Karwowska Z., Gonciarz W., Allushi B., Staczek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2017, vol. 23, no. 9, pp. 1521–1540. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1521
5. Herpers B.L., Immink M.M., De Jong B.A., Van Velzen-Blad H., De Jongh B.M., Van Hannen E.J. Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. *Mol. Immunol.*, 2006, vol. 43, no. 7, pp. 851–855. doi: 10.1016/j.molimm.2005.06.035
6. Ko G.H., Kang S.M., Kim Y.K., Lee J.H., Park C.K., Youn H.S., Baik S.C., Cho M.J., Lee W.K., Rhee K.H. Invasiveness of *Helicobacter pylori* into human gastric mucosa. *Helicobacter*, 1999, vol. 4, no. 2, pp. 77–81.
7. Kuipers S., Aerts P.C., Van Dijk H. Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 36, no. 1–2, pp. 33–39.
8. Lipscombe R.J., Sumiya M., Hill A.V., Lau Y.L., Levinsky R.J., Summerfield J.A., Turner M.W. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum. Mol. Genet.*, 1992, vol. 1, no. 9, pp. 709–715.
9. Lipscombe R.J., Sumiya M., Summerfield J.A., Turner M.W. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology*, 1995, vol. 85, no. 4, pp. 660–667.

10. Ma J., Wu D., Hu X., Li J., Cao M., Dong W. Associations between cytokine gene polymorphisms and susceptibility to Helicobacter pylori infection and Helicobacter pylori related gastric cancer, peptic ulcer disease: a meta-analysis. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 4: e0176463. doi: 10.1371/journal.pone.0176463
11. Miftahussurur M., Yamaoka Y. Helicobacter pylori virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015, vol. 9, no. 12, pp. 1535–1547. doi: 10.1586/17474124.2015.1095089
12. Mortazavi E., Eslami B., Aghahosseini P., Ahron F., Amininejad A., Mahmoodi S., Satarpour H., Radmanesh N., Rassi H. Association of mannose-binding lectin rs1800450 and tumor necrotic factor-alpha rs1800620 polymorphism with Helicobacter pylori in type II diabetes mellitus. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2017, vol. 36, no. 5, pp. 236–241. doi: 10.1089/mab.2017.0039
13. Scudiero O., Nardone G., Omodei D., Tatangelo F., Vitale D.F., Salvatore F., Castaldo G. A mannose-binding lectin-defective haplotype is a risk factor for gastric cancer. *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 8, pp. 1625–1627. doi: 10.1373/clinchem.2006.071696
14. Tahara T., Shibata T., Wang F.Y., Nakamura M., Yamashita H., Yoshioka D., Okubo M., Maruyama N., Kamiya Y., Nakamura M., Fujita H., Nagasaka M., Iwata M., Takahama K., Watanabe M., Nakano H., Hirata I., Arisawa T. Mannan-binding lectin B allele is associated with a risk of developing more severe gastric mucosal atrophy in Helicobacter pylori-infected Japanese patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, vol. 21, no. 7, pp. 781–786. doi: 10.1097/MEG.0b013e328309c76b
15. Wang F.Y., Tahara T., Arisawa T., Shibata T., Yamashita H., Nakamura M., Yoshioka D., Okubo M., Maruyama N., Kamano T., Kamiya Y., Nakamura M., Fujita H., Nagasaka M., Iwata M., Takahama K., Watanabe M., Nakano H., Hirata I. Mannan-binding lectin (MBL) polymorphism and gastric cancer risk in Japanese population. *Dig. Dis. Sci.*, 2008, vol. 53, no. 11, pp. 2904–2908. doi: 10.1007/s10620-008-0249-3

Авторы:

Терещенко С.Ю., д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением соматического и психического здоровья детей НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;
Смольникова М.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и физиологии НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;
Зобова С.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник клинического отделения соматического и психического здоровья детей НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия; научный сотрудник кафедры медицинской генетики и нейрофизиологии Института последипломного образования ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Tereshchenko S.Yu., PhD, MD (Medicine), Head of Clinical Department of Childhood Somatic and Mental Health, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Pathology and Physiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Zobova S.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation; Researcher, Department of Medical Genetics and Neurophysiology, Institute of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.05.2018
Отправлена на доработку 05.04.2019
Принята к печати 11.04.2019

Received 14.05.2018
Revision received 05.04.2019
Accepted 11.04.2019

ВЛИЯНИЕ *HELICOBACTER PYLORI* НА ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АТРОФИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ

О.В. Смирнова, А.А. Синяков

НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия

Резюме. В настоящее время уровень инфицированности *Helicobacter pylori* зависит от области проживания, пола и возраста обследованных лиц, и может достигать до 95% от общей популяции. Адаптация *H. pylori* в окружающей среде выражается в ее способности к адгезии к эпителию слизистой оболочки желудка (СОЖ) и модуляции экспрессии собственных вирулентных факторов. Согласно современным представлениям, *H. pylori* может выживать внутри эпителиальных клеток, уклоняясь от иммунной реакции инфицированного организма. Цитокины продуцируются клетками иммунной системы и выступают в роли регуляторов основных этапов ее жизнедеятельности. Запущенный каскад цитокиновых реакций при инфицировании организма бактерией *H. pylori*, вызывает развитие иммунных реакций, прогрессирование хронических воспалительных и деструктивных процессов в слизистой оболочке желудка. Роль цитокинов при предраковых заболеваниях желудка неоднозначна, с одной стороны, они активируют иммунный ответ, направленный на элиминацию патогена, с другой, сами способствуют прогрессированию заболевания. Целью нашего исследования явилось изучение содержания некоторых цитокинов и особенностей цитокиновой регуляции у мужчин среднего возраста с хроническим и хроническим атрофическим гастритом, инфицированными *H. pylori*. У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* отмечалось увеличение цитокина IL-2, что может способствовать увеличению повреждающего действия цитотоксических лимфоцитов, так и реализации противоопухолевого эффекта. В нашем исследовании у больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* происходила гиперпродукция IL-8, что приводит к абсолютному повышению количества палочкоядерных нейтрофилов в периферической крови и снижению их фагоцитарной активности, что свидетельствует о нарушении защитных механизмов организма. У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* происходило увеличение активности цитокина IFN γ , который участвует в распознавании злокачественно трансформированных клеток и усиливает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости на антигенпрезентирующих клетках. У больных ХГ с *H. pylori* и ХАГ с *H. pylori* происходило увеличение продукции IL-4, что можно рассматривать как фактор, способствующий хронизации заболеваний, связанных с *H. pylori*-инфекцией. Гиперпродукция цитокинов Th1- и Th2-хелперов, свидетельствует об активации иммунитета по Th1- и Th2-типам при хронических гастритах, ассоциированных с *H. pylori*. Мощный провоспалительный цитокиновый каскад запускает воспалительные изменения в слизистой оболочке желудка с развитием нейтрофильной инфильтрации и активацией лимфоцитов. Повреждение и гибель эпителиоцитов на фоне воспаления формируют эрозивные и язвенные дефекты, или изменения в виде атрофии, метаплазии и неоплазии СОЖ. Полученные результаты можно использовать в качестве дополнительных диагностических критериев в ранней диагностике предраковых заболеваний желудка.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, хронический гастрит, предраковые состояния желудка, цитокины, иммуноферментный анализ.

Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
ФИЦ КНЦ СО РАН, обособленное подразделение
НИИ медицинских проблем Севера.
Тел./факс: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Contacts:

Olga V. Smirnova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana
Zheleznyaka str., 3G, Scientific Research Institute
of Medical Problems of the North.
Phone/fax: +7 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Библиографическое описание:

Смирнова О.В., Синяков А.А. Влияние *Helicobacter pylori* на особенности цитокиновой регуляции при хроническом атрофическом гастрите // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 187–192. doi: 10.15789/2220-7619-IOH-1167

Citation:

Smirnova O.V., Sinyakov A.A. Influence of *Helicobacter pylori* on cytokine regulation in chronic atrophic gastritis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 187–192. doi: 10.15789/2220-7619-IOH-1167

INFLUENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* ON CYTOKINE REGULATION IN CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS

Smirnova O.V., Sinyakov A.A.

Research Institute of Medical Problems of the North FIC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. At present, the level of *Helicobacter pylori* infection is determined by geographic area, gender and age of the examined individuals, and can reach up to 95% of the total population. Environmental adaptation of *H. pylori* is exhibited in its ability to adhere to the gastric mucosal epithelium and modulated expression of its own virulent factors. Current concepts implicate that *H. pylori* can survive inside epithelial cells, evading host immune response. Cytokines are produced by immune cells and act to regulate its major stages. A cytokine cascade launched after *Helicobacter pylori* infection triggers immune reactions, progression of chronic inflammatory and destructive processes in the gastric mucosa. The role of cytokines in precancerous diseases of the stomach is ambiguous because, on the one hand, they activate immune response aimed at eliminating the pathogen, whereas on the other hand, they do contribute to the disease progression. The aim of our study was to examine profile of some cytokines and features of cytokine regulation in *H. pylori*-infected middle-aged males with chronic gastritis (CG) as well as chronic atrophic gastritis (CAG). In patients with CG with *H. pylori*, CAG and CAG with *H. pylori*, an increase in the cytokine IL-2 was observed that might contribute to augmented damaging effect of cytotoxic lymphocytes, as well as implementation of antitumor effect. CAG with *H. pylori* was featured with IL-8 hyperproduction, which resulted in increased absolute numbers of band neutrophils in peripheral blood and their decreased phagocytic activity evidencing about altered host defense mechanisms. There was increased amount of IFN γ involved in recognition of malignantly transformed cells and upregulated expression of the major histocompatibility complex molecules on antigen-presenting cells. In patients with CG with *H. pylori* and CAG with *H. pylori*, production of IL-4 was increased, which might serve as a contributing factor to the chronicity of *H. pylori*-associated diseases. Overproduction of type 1 and type 2 cytokines indicates about activated Th1 and Th2 type immune reactions in *H. pylori*-associated CG. A potent pro-inflammatory cytokine cascade triggers inflammatory changes in gastric mucosa with developing neutrophil infiltration and lymphocyte activation. Damage and death of epithelial cells upon inflammation form erosive and ulcerative defects, or changes manifested as gastric mucosal atrophy, metaplasia and neoplasia. The data obtained may be used as additional diagnostic criteria in early diagnostics of precancerous stomach diseases.

Key words: *Helicobacter pylori*, chronic gastritis, precancerous conditions of the stomach, cytokines, enzyme immunoassay.

Введение

Helicobacter pylori (*H. pylori*) — граммотрицательная спиралевидная бактерия, поражающая слизистую оболочку желудка (СОЖ) и двенадцатиперстной кишки [14]. Чаще всего микроорганизм паразитирует в антральной области желудка, где отсутствуют париетальные клетки. В настоящее время уровень инфицированности *H. pylori* зависит от области проживания, пола и возраста обследованных лиц, и может достигать 95% от общей популяции [15]. Воспалительные изменения в СОЖ возникают только у 10% инфицированных лиц, приводя к развитию клинической картины хронического атрофического гастрита, язвенной болезни, аденокарциномы желудка и др.[16].

Адаптация *H. pylori* к условиям окружающей среды выражается в ее способности к адгезии к эпителию СОЖ и модуляции экспрессии собственных вирулентных факторов. Согласно современным представлениям, *H. pylori* может выживать внутри эпителиальных клеток, уклоняясь от иммунной реакции инфицированного организма [10].

Цитокины продуцируются клетками иммунной системы и выступают в роли регуляторов основных этапов ее жизнедеятельности.

Цитокины при взаимодействии с клеточными рецепторами на поверхности клеток, активируют соответствующие гены, экспрессия которых приводит к синтезу специфических белков, используемых для регуляции перечисленных выше процессов [1]. Запущенный каскад цитокиновых реакций при инфицировании организма бактерией *H. pylori*, вызывает развитие иммунных реакций, прогрессирование хронических воспалительных и деструктивных процессов в слизистой оболочке желудка. Таким образом, стимулированная цитокиновая секреция способствует активации клеток иммунной системы и развитию воспалительных изменений. Однако гиперпродукция цитокинов может содействовать развитию атрофических изменений СОЖ, а в дальнейшем трансформации в рак желудка. Таким образом, роль цитокинов при предраковых заболеваниях желудка неоднозначна: с одной стороны, они активируют иммунный ответ, направленный на элиминацию патогена, с другой, способствуют прогрессированию заболевания. Целью нашего исследования явилось изучение содержания некоторых цитокинов и особенностей цитокиновой регуляции у мужчин среднего возраста с хроническим и хроническим атрофическим гастритом (ХГ и ХАГ), инфицированных *H. pylori*.

Материалы и методы

Исследование проводилось с разрешения этического комитета НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН (протокол № 11 от 11.11.2013). В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации [4]. Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, подтверждающее его добровольное участие в исследовании.

В исследование были включены только мужчины среднего возраста (от 45 до 59 лет). Клиническое обследование мужчин, больных ХГ и ХАГ, осуществлялось в гастроэнтерологическом отделении НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН. Включение пациентов в исследование, взятие биологического материала проводилось при поступлении больных в стационар до начала терапии. Материалом исследования была венозная кровь, которая бралась у больного утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены, в пробирки Vacutainer с разделительным гелем и двойным активатором свертывания (кремнезем) и Vacutainer с раствором гепарина натрия (5 ЕД/мл).

Контрольная группа была сформирована из 63 мужчин среднего возраста (48,7±3,9 лет) без гастроэнтерологических жалоб и гастроэнтерологического анамнеза, без изменений СОЖ, с уровнем пепсиногена-1 в сыворотке крови более 50 мкг/л и соотношением пепсиноген-1/пепсиноген-2 более 3. В исследование не включались пациенты с ВИЧ-инфекцией, страдающие гепатитом, туберкулезом, с язвенной болезнью желудка, имеющие сопутствующие острые и хронические заболевания в фазе обострения. Так же в исследование не включались пациенты, отказавшиеся принять в них участие.

Вторая группа состояла из 58 пациентов мужского пола (46,3±1,9 лет), страдающих ХГ. Диагноз устанавливался врачом-гастроэнтерологом на основании эпидемиологических, клинических данных и подтверждался нормальным содержанием пепсиногенов в сыворотке крови методом ИФА и воспалительными изменениями слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка при фиброэзофагогастродуоденоскопии (ФЭГДС). Критерии исключения были те же, что и в контрольной группе.

Третья группа состояла из пациентов мужского пола (61 человек, 50,4±3,9 лет), страдающих ХГ в сочетании *H. pylori*-инфекцией. Диагноз устанавливался врачом-гастроэнтерологом на основании эпидемиологических, клинических данных и подтвержден нормальным содержанием пепсиногенов в сыворотке

крови методом ИФА и воспалительными изменениями слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка при ФЭГДС, наличием антител к *H. pylori*. Критерии исключения были те же, что и в контрольной группе.

В 4 группу входили 28 больных мужского пола (51,2±4,9 лет), страдающих ХАГ. Диагноз выставлен врачом-гастроэнтерологом на основании эпидемиологических, клинических данных и подтвержден серологическим исследованием пепсиногенов методом ИФА и атрофическими изменениями слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка с использованием модифицированной Сиднейской классификации при ФЭГДС. Диагноз выраженного атрофического гастрита слизистой оболочки тела желудка ставили при уровне пепсиногена-1 менее 25 мкг/л и значении отношения пепсиноген-1/пепсиноген-2 менее 3 с морфологическими признаками атрофических изменений СОЖ, полученной в результате прицельной биопсии. Значение пепсиногена-1 от 25 до 50 мкг/л при отношении пепсиноген-1/пепсиноген-2 более 3 с морфологическими признаками атрофии СОЖ расценивалось как легкая и средняя степень атрофии тела желудка. Критерии исключения аналогичны контрольной группе.

В 5 группу входили 26 больных мужского пола (49,1±4,4 лет), страдающих ХАГ в сочетании с *H. pylori*-инфекцией. Диагноз выставлен врачом-гастроэнтерологом на основании эпидемиологических, клинических данных и подтвержден серологическим исследованием пепсиногенов методом ИФА и атрофическими изменениями слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка с использованием модифицированной Сиднейской классификации при ФЭГДС и наличием антител к *H. pylori*. Диагноз выраженного атрофического гастрита слизистой оболочки тела желудка ставили при уровне пепсиногена-1 менее 25 мкг/л и значении отношения пепсиноген-1/пепсиноген-2 менее 3 с морфологическими признаками атрофических изменений СОЖ, полученной в результате прицельной биопсии. Значение пепсиногена-1 от 25 до 50 мкг/л при отношении пепсиноген-1/пепсиноген-2 более 3 с морфологическими признаками атрофии СОЖ расценивалось как легкая и средняя степень атрофии тела желудка. Критерии исключения были аналогичны таковым в контрольной группе.

Во всех группах выявляли наличие *H. pylori* методом ИФА с помощью определения титра специфических антител к антигену CagA *H. pylori*. Титры антител от 30 EIU и более считали положительным результатом, менее 30 EIU — отрицательным результатом определения *H. pylori*. Таким образом были определены группы без *H. pylori* и в сочетании с *H. pylori*-инфекцией.

Уровни IL-2, IL-4, IL-8, TNF α , IFN γ в сыворотке крови больных и здоровых лиц определяли с помощью метода ИФА с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) [8].

По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц Microsoft Excel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel 2007 (Microsoft, США). Обработка полученных данных включала подсчет непараметрических данных: медиану (Me) и перцентили (C₂₅–C₇₅) [5]. Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$ [7, 9, 18].

Результаты и обсуждение

Для изучения цитокиновой регуляции мы исследовали содержание некоторых провоспалительных (TNF α , IL-2, IFN γ , IL-8) и противовоспалительного цитокинов (IL-4) (табл.).

IL-2 продуцируется Т-хелперами 1 типа (Th-1), продукция данного цитокина на фоне *H. pylori*-инфекции может привести к атрофии

и ингибированию желудочной секреции [2, 11, 12, 13]. У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* отмечалось повышение медианы IL-2 ($p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} < 0,001$; $p_{1-5} < 0,001$; $p_{2-5} < 0,001$). Увеличение продукции IL-2 может способствовать увеличению повреждающего действия цитотоксических лимфоцитов, так и реализации противоопухолевого эффекта.

Функцию хемотаксического фактора для нейтрофилов выполняет IL-8, который стимулирует экспрессию молекул межклеточной адгезии; уровень продукции цитокина ассоциирован с выраженностью и характером развития воспаления в слизистой оболочке желудка [2]. В нашем исследовании у больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* происходило повышение медианы IL-8 больше чем в 10 раз ($p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} < 0,001$; $p_{1-5} < 0,001$; $p_{2-5} < 0,001$) по сравнению с группой больных ХГ и контрольной группой. Гиперпродукция IL-8 приводит к абсолютному повышению палочкоядерных нейтрофилов в периферической крови и снижению их фагоцитарной активности, что свидетельствует о нарушении защитных механизмов организма [2].

IFN γ стимулирует функциональную активность NK- и CD8⁺ клеток, которые являются основными эффекторами противоопухолевого иммунитета, данный цитокин осуществляет

Таблица. Содержание цитокинов у больных хроническим гастритом (ХГ) и хроническим атрофическим гастритом (ХАГ) без и в сочетании с *H. pylori*-инфекцией относительно контрольной группы (Me, C₂₅–C₇₅, p_{m-u})

Table. Cytokine content in patients with chronic gastritis (CG) and chronic atrophic gastritis (CAG) without and in combination with *H. pylori*-infection relative to the control group (Me, C₂₅–C₇₅, p_{m-u})

Показатели Indicators	Контрольная группа (1) Control group (1) N = 63		Больные ХГ без <i>H. pylori</i> (2) Patients with CG without <i>H. pylori</i> (2) N = 58		Больные ХГ с <i>H. pylori</i> (3) Patients with CG with <i>H. pylori</i> (3) N = 61		Больные ХАГ без <i>H. pylori</i> (4) Patients with CAG without <i>H. pylori</i> (4) N = 28		Больные ХАГ с <i>H. pylori</i> (5) Patients with CAG with <i>H. pylori</i> (5) N = 26	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	0,54	0,38–0,87	0,58	0,38–0,87	0,67	0,44–0,93	0,78	0,56–1,3	0,78	0,56–1,3
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	1,1	0,5–3,05	3,2	3,5–5,05	5,7	3,6–10,3	4,7	3,4–6,5	4,9	3,8–9,5
			$p_{1-2} = 0,01$		$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$		$p_{1-5} < 0,001$ $p_{2-5} < 0,001$	
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	2,1	0,5–4,0	4,2	3,5–7,4	40,5	7,5–97,2	35,5	5,9–73,1	38,1	5,5–87,3
					$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$		$p_{1-5} < 0,001$ $p_{2-5} < 0,001$	
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/ml	0,6	0,22–4,0	1,9	0,6–4,0	2,9	2,2–4,0	3,1	2,5–4,3	3,2	2,3–4,8
					$p_{1-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$		$p_{1-5} < 0,001$	
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	7,0	5,6–7,8	6,7	4,6–8,8	86,8	76,8–103,5	7,4	5,2–9,3	91,4	73,2–112,3
					$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$		$p_{3-4} < 0,001$		$p_{1-5} < 0,001$ $p_{2-5} < 0,001$ $p_{4-5} < 0,001$	

антипролиферативное действие в отношении опухолевых клеток и подавляют ангиогенез [3, 17]. У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* происходило повышение медианы $IFN\gamma$ в 1,5 раза относительно больных ХГ и контрольной группы ($p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} < 0,001$; $p_{1-5} < 0,001$; $p_{2-5} < 0,001$). Увеличение активности цитокина $IFN\gamma$, который участвует в распознавании злокачественно трансформированных клеток, усиливает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости на антигенпрезентирующих клетках.

IL-4 образуется Т-хелперами 2 типа (Th2), ответственными преимущественно за гуморальный иммунитет. IL-4, принимает участие в ограничении воспалительного ответа, подавляя секрецию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α) и регулирует, таким образом, тяжесть повреждения тканей. У больных ХГ с *H. pylori* и ХАГ с *H. pylori* медиана IL-4 повышалась больше чем в 10 раз по сравнению с группой больных ХГ без *H. pylori*, ХАГ без *H. pylori* и контрольной группой ($p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$; $p_{3-4} < 0,001$; $p_{1-5} < 0,001$; $p_{2-5} < 0,001$; $p_{4-5} < 0,001$). Увеличение продукции IL-4 рассматривается как фактор, способствующий хронизации заболеваний, связанных с *H. pylori*-инфекцией [6].

Многие авторы считают, что гиперпродукция цитокинов, таких как IL-2, IL-8, $IFN\gamma$, IL-4 и многих других, при *H. pylori* инфекции запус-

кает развитие и перерождение ХАГ. В нашем исследовании мы выявили, что у пациентов страдающих хроническими гастритами, ассоциированными с *H. pylori*-инфекцией происходит больше всего нарушений в цитокиновой регуляции: у всех пациентов обнаруживается гиперпродукция как провоспалительных (IL-2, IL-8, $IFN\gamma$), так и противовоспалительного (IL-4) цитокинов.

Таким образом, у больных ХГ происходило повышение провоспалительного цитокина IL-2, что свидетельствовало о Th1-опосредованном иммунном ответе. В группах больных ХГ с *H. pylori* и группах ХАГ с и без *H. pylori* отмечалось увеличение провоспалительных (IL-2, $IFN\gamma$, IL-8) и противовоспалительного цитокина (IL-4), что может указывать на активацию и дисбаланс системы цитокиновой регуляции. Гиперпродукция цитокинов Th1- и Th2-хелперов, свидетельствует об активации иммунитета по Th1- и Th2-типам при хронических гастритах, ассоциированных с *H. pylori*. Мощный провоспалительный цитокиновый каскад запускает воспалительные изменения в слизистой оболочке желудка с развитием нейтрофильной инфильтрации и активацией лимфоцитов. Повреждение и гибель эпителиоцитов на фоне воспаления формируют эрозивные и язвенные дефекты или изменения в виде атрофии, метаплазии и неоплазии СОЖ.

Список литературы/References

- Ильина А.Е., Станислав М.Л., Денисов Л.Н., Насонов Е.Л. Интерлейкин 1 как медиатор воспаления и терапевтическая мишень // Научно-практическая ревматология. 2011. № 3. С. 62–71. [Irina A.E., Stanislav M.L., Denisov L.N. Interleukin 1 as a mediator of inflammation and therapeutic target. *Nauchno prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2011, no. 3, pp. 62–71. (In Russ.)]
- Козлов В.К. Цитокинотерапия: патогенетическая направленность при инфекционных заболеваниях и клиническая эффективность: Руководство для врачей. СПб.: Альтер Эго, 2010. 148 с. [Kozlov V.K. Cytokine therapy: pathogenetic orientation in infectious diseases and clinical efficacy: a guide for physicians. *St. Petersburg: Alter Ego*, 2010. 148 p. (In Russ.)]
- Ксензова Т.И., Аникина Е.В., Ананьева О.В., Болдырева О.П., Иларионова Л.А., Шанина Л.В. Роль иммунофенотипирования клеток костного мозга и ликвора в диагностике множественной миеломы и плазмноклеточного лейкоза // Фундаментальные исследования. 2012. № 8–1. С. 101–106. [Ksenzova T.I., Anikina E.V., Ananeva O.V., Boldyreva O.P., Parionov L.A., Shanina L.V. The role of immunophenotyping of cells of the bone marrow and cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2012, no. 8–1, pp. 101–106. (In Russ.)]
- Кузнецов В.П. Интерфероны в каскаде цитокинов: исторический и современный аспекты // Антибиотики и химиотерапия. 1998. № 5. С. 28–40. [Kuznetsov V.P. Interferons in the cytokine cascade: historical and modern aspects. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 1998, no. 5, pp. 28–40. (In Russ.)]
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета статистических программ Statistica. М.: Медиа Сфера, 2006. 312 с. [Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application of statistical software package Statistica. *Moscow: Media Sphere*, 2006. 312 p. (In Russ.)]
- Саранчина Ю.В., Агеева Е.С. Особенности продукции интерлейкина-8 при *Helicobacter pylori*-ассоциированном атрофическом гастрите. Абакан: ФГБОУ ВПО Хакаский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, 2013. С. 44–48. [Sarachina Yu.V., Ageeva E.S. Features of the production of interleukin-8 with *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis. *Abakan: N.F. Katanov Khakas State University*, 2013, pp. 44–48. (In Russ.)]
- Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Клинико-иммунологические особенности инфекционных осложнений у больных множественной миеломой // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. № 5. С. 534–540. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N. Clinical and immunological features of infectious complications in patients with multiple myeloma. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, no. 5, pp. 534–540. (In Russ.)]

8. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Состояние иммунного статуса и особенности цитокиновой регуляции у больных на разных стадиях миеломной болезни // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 6–1. С. 78–82. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N. The state of the immune status and characteristics of cytokine regulation in patients at different stages of myeloma. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 6–1, pp. 78–82. (In Russ.)]
9. Смирнова О.В., Цуканов В.В., Каспаров Э.В., Синяков А.А., Васютин А.В. Особенности неспецифического звена иммунитета у больных хроническим атрофическим гастритом // *В мире научных открытий*. 2016. № 1 (73). С. 53–74. [Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Kasparov E.V., Sinyakov A.A., Vasyutin A.V. Features of the nonspecific immunity in patients with chronic atrophic gastritis. *V mire nauchnykh otkrytiy = In the World of Scientific Discoveries*, 2016, no. 1 (73), pp. 53–74. (In Russ.)]
10. Фадеев Г.Д. Инфекция *Helicobacter pylori*: итоги 20-летнего изучения ее патогенности // *Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина*. Серия: Медицина. 2004. № 7 (614). С. 115–119. [Fadeenko G.D. *Helicobacter pylori* infection: results of a 20-year study of its pathogenicity. *Vestnik HNU im. V.N. Karazina. Seriya: Meditsina = Bulletin of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: Medicine*, 2004, no. 7 (614). С. 115–119. (In Russ.)]
11. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты: Руководство для врачей. СПб., 1998. 113 с. [Freidlin I.S. The immune system and its defects: a guide for doctors. *St. Petersburg*, 1998. 113 p. (In Russ.)]
12. Царегородцева Т.М., Серова Т.И. Цитокины в гастроэнтерологии. М.: Анархис, 2003. 96 с. [Tsaregorodtseva T.M., Serova T.I. Cytokines in gastroenterology. *Moscow: Anarchis*, 2003. 96 p. (In Russ.)]
13. Штыгашева О.В., Агеева Е.С., Иптышев В.М. Роль иммунорегуляторных цитокинов в патогенезе хронического гастрита и язвенной болезни, поиск предикторов заболеваний // *Сибирский медицинский журнал*. 2011. № 1. С. 88–90. [Shtygasheva O.V., Ageeva E.S., Iptyshev V.M. The role of immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of chronic gastritis and peptic ulcer disease, the search for predictors of diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2011, no. 1, pp. 88–90. (In Russ.)]
14. Blaser M.J. An endangered species in the stomach. *Sci. Am.*, 2005, vol. 292, no. 2, pp. 38–45. doi: 10.1038/scientificamerican0205-38
15. Frenck R., Clemens J. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect.*, 2003, no. 5, pp. 705–713.
16. Malferteiner P., Megraud F., O'Morain C.A. Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV. Florence Consensus Report The European *Helicobacter* Study Group (EHSG). *Gut*, 2012, no. 61, pp. 646–664.
17. Sakamoto S., Ryan A.J., Kyprianou N. Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. *J. Cell Biochem.*, 2008, vol. 103, no. 3, pp. 691–708.
18. Smirnova O., Tsukanov V., Kasparov E., Sinyakov A. Features of humoral immunity in *H. pylori*-associated diseases of stomach. *Helicobacter*, 2016, vol. 21, no. S1, p. 162.

Авторы:

Смирнова О.В., д.м.н., доцент, зав. лабораторией клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Синяков А.А., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Clinical Pathophysiology Laboratory, Research Institute of Medical Problems of the North FIC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Sinyakov A.A., PhD (Biology), Junior Researcher, Clinical Pathophysiology Laboratory, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, FIC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.03.2019
Отправлена на доработку 05.06.2019
Принята к печати 19.06.2019

Received 21.03.2019
Revision received 05.06.2019
Accepted 19.06.2019

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ХИЩНЫХ ЖИВОТНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕМ *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* В СРЕДНЕЙ ПОЛОСЕ РОССИИ

О.Н. Андреев

Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», Москва, Россия

Резюме. Промысловые хищники являются окончательными хозяевами многих биогельминтов, представляющих опасность для человека и других животных. Для борьбы с возбудителями опасных гельминтозоонозов следует объединять усилия научно-практических центров, различных министерств и органов исполнительной власти, правопорядка и населения. Изучение паразитофауны охотничье-промысловых животных особенно актуально в Центральном регионе России с большой плотностью населения, где человек издавна занимается промыслом и имеет тесный контакт как с пушными зверями, так и с собственными домашними питомцами (собаки, кошки). Возбудитель альвеолярного эхинококкоза — *Echinococcus multilocularis* — типичный представитель природно-очагового заболевания. Исследования были направлены на изучение динамики регистрации случаев возбудителя *E. multilocularis* у промысловых животных Центрального региона России. Распространение цестоды изучали в период с 2007 по 2018 гг. Материал для исследований (трупы, тушки, фрагменты органов и тканей) получали из охотничьих угодий Владимирской, Нижегородской, Московской, Тверской, Орловской и Брянской областей региона и Республики Карелия. Животных исследовали методом полных или частичных гельминтологических вскрытий по К.И. Скрябину (1928). Было исследовано 262 животных, в том числе 193 обыкновенных лисицы, 28 домашних и 16 енотовидных собак, 16 домашних кошек, 6 волков, 2 бурых медведя и одна рысь. Зараженными цестодой *E. multilocularis* оказались 46 лисиц (23,8%), 3 енотовидные собаки (18,7%), 3 волка (50%) и одна домашняя собака (3,6%). В течение периода исследований наибольшая экстенсивность инвазии (ЭИ) цепнем плотоядных была отмечена в 2010–2011 гг. (42,4%), 2011–2012 гг. (37,1%) и в 2012–2013 гг. (42,1%) у лисиц и енотовидных собак. В сезоны проведения спортивной охоты 2009–2010 и 2013–2014 гг. не отмечено ни одного случая заражения плотоядных животных цепнем. Возбудитель альвеолярного эхинококкоза регулярно регистрируется в Рязанской и Владимирской областях. Интенсивность инвазии у животных различна, у лисиц она колеблется от 12 до 40 000 экземпляров цепней на голову, у енотовидных собак — от 37 до 112 экземпляров, у волков — от 12 до 318 экземпляров и у домашней собаки — 19 экземпляров. Результаты собственных исследований, проведенных в 2007–2018 гг., указывают на функционирование в Центральном регионе России очагов альвеолярного эхинококкоза.

Ключевые слова: енотовидная собака, инвазия, обыкновенная лисица, цестода, *Echinococcus multilocularis*.

Адрес для переписки:

Андреев Олег Николаевич
117218, Россия, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28,
Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной
паразитологии животных и растений — филиал ФГБНУ
«Федеральный научный центр — Всероссийский НИИ
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина
и Я.Р. Коваленко РАН».
Тел./факс: 8 (499) 124-56-55 (служебн.); 8 (962) 941-00-43 (моб.).
E-mail: 1980oleg@mail.ru

Contacts:

Oleg N. Andreyanov
117218, Russian Federation, Moscow, Bolshaya
Cheremushkinskaya str., 28, All-Russian Scientific Research
Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals
and Plants, Federal Scientific Center — K.I. Skryabin and
Y.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute
of Experimental Veterinary Medicine of the Russian
Academy of Sciences.
Phone/fax: +7 (499) 124-56-55 (office); +7 (962) 941-00-43 (mobile).
E-mail: 1980oleg@mail.ru

Библиографическое описание:

Андреев О.Н. Исследование зараженности некоторых видов хищных животных возбудителем *Echinococcus multilocularis* в средней полосе России // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 193–196. doi: 10.15789/2220-7619-EEM-1182

Citation:

Andreyanov O.N. Examining *Echinococcus multilocularis* infection in some Midland Russia predatory animal species // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 193–196. doi: 10.15789/2220-7619-EEM-1182

EXAMINING *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* INFECTION IN SOME MIDLAND RUSSIA PREDATORY ANIMAL SPECIES

Andreyanov O.N.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants — Branch of the «Federal Scientific Center — K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russian Federation

Abstract. Commercially exploited predator animal species are considered as a final host for multiple biohelminths posing a threat both to human and other animals. Fight against pathogens of dangerous helminthozoonoses should be based on combining efforts of scientific and practical centers, various state departments, executive authorities, law enforcement authorities as well as country residents. Examining parasitic fauna in commercially exploited predator animals is of special priority in the Midland Russia with high population density, wherein people have been engaged in hunting closely contacting both with fur animals as well as domestic pets (dogs, cats). Alveococcosis is a natural focal disease caused by *Echinococcus multilocularis*. The study was aimed at examining dynamics of *E. multilocularis* recording in the Midland Russia commercially exploited predator animals. 2007–2018 Cestode spread was examined. A research material for (corpses, carcasses, body and tissue fragments) was obtained hunting reserves located in the Vladimir, Nizhny Novgorod, Moscow, Tver, Oryol and Bryansk regions of the Midland Russia as well as the Republic of Karelia. Complete or partial helminthological autopsy carried out in accordance with K.I. Scriabin technique (1928) was performed in 262 animals, including 193 common red foxes, 28 domestic and 16 raccoon dogs, 16 domestic cats, 6 wolves, 2 brown bears and one lynx. It was shown that cestodes *E. multilocularis* was found in 46 foxes (23.8%), 3 raccoon dogs (18.7%), 3 wolves (50%) and one domestic dog (3.6%). Moreover, the peak tapeworm prevalence in carnivorous animals was noted for foxes and raccoon dogs in 2010–2011 (42.4%), 2011–2012 (37.1%) and 2012–2013 (42.1%). On the other hand, no tapeworm invasion in carnivores was noted during 2009–2010 and 2013–2014 sports hunting seasons. However, a causative agent of alveococcosis is routinely detected in the Ryazan and Vladimir regions. The prevalence of invasion in animals differs in foxes, raccoon dogs, wolves ranging from 12 to 40,000, in raccoon dogs — from 37 to 112, in wolves — from 12 to 318 tapeworms per animal, and in domestic dog reaching 19 worms per animal. The data of 2007–2018 personal studies point at spread of alveococcosis foci in the Midland Russia.

Key words: raccoon dog, invasion, ordinary fox, cestode, *Echinococcus multilocularis*.

Хищные млекопитающие являются окончательными хозяевами многих биогельминтов, представляющих опасность для человека и других животных. Борьба с возбудителями опасных гельминтозов должна быть комплексной и согласованной: следует объединять усилия научно — практических центров, различных министерств и органов исполнительной власти, правопорядка и населения. Регистрируемая в настоящее время невысокая интенсивность инвазий животных городской популяции сохраняется благодаря лечебным и профилактическим противопаразитарным обработкам, а также соблюдению требований ветеринарного законодательства. Изучение паразитофауны охотничье-промысловых животных особенно актуально в Центральном регионе России с большой плотностью населения, где человек издавна занимается промыслом и имеет тесный контакт как с пушными зверями, так и с собственными домашними питомцами (собаки, кошки). Возбудитель альвеолярного эхинококкоза — *Echinococcus multilocularis* — типичный представитель природноочагового зоонозного заболевания.

Целью настоящего исследования было изучение зараженности некоторых видов (самых распространенных и добываемых в последние годы) хищных промысловых животных на обнаружение взрослой (имагинальной) формы

возбудителя альвеолярного эхинококкоза путем полного гельминтологического вскрытия тушек, полученных из охотугодий средней полосы России.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили трупы, тушки, фрагменты органов и тканей животных, полученные из охотничьих угодий Владимирской, Нижегородской, Московской, Тверской, Орловской и Брянской областей региона в течение 2007–2018 гг. Животных исследовали методом полных гельминтологических вскрытий по К.И. Скрыбину (1928) [1, 5]. Исследования по обнаружению имагинальных форм цестод из рода *Echinococcus* проводили с соблюдением мер личной безопасности и мер, исключающих распространение возбудителя. После исследования биологический материал стерилизовали автоклавированием в вертикальном аппарате модели «Sanyo MLS-3781» (Корея) в течение 2 ч при давлении в 1,5 атм.

Результаты и обсуждения

Было исследовано 262 животных, в том числе 193 обыкновенных лисы, 28 домашних и 16 енотовидных собак, 16 домашних кошек, 6 волков, 2 бурых медведя и одна рысь

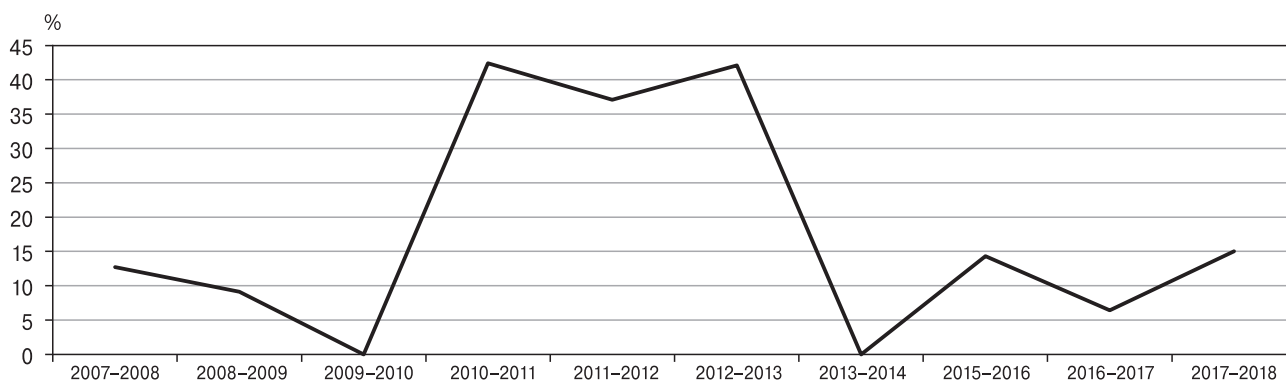
Таблица. Видовой состав плотоядных зараженных *E. multilocularis*Table. Specific structure carnivorous infected with *E. multilocularis*

Вид животного (латинское название вида) Species of an animal (Latin name of a species)	Количество исследованных, абс. Quantity investigated, abs.		Показатель ЭИ, % Indicator EI, %	Число цестод в кишечнике Number cestodes in intestines
	всего all	инвазировано infest		
Лисица обыкновенная (<i>Vulpes vulpes</i>) Ordinary fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	193	46	23,8	12–40 000
Собака домашняя (<i>Canis familiaris</i>) Domestic dog (<i>Canis familiaris</i>)	28	1	3,6	19
Собака енотовидная (<i>Nyctereutes procyonoides</i>) Raccoon dog (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	16	3	18,7	37–112
Кошка домашняя (<i>Felis silvestris catus</i>) Domestic cat (<i>Felis silvestris catus</i>)	16	0	–	–
Волк (<i>Canis lupus</i>) Wolf (<i>Canis lupus</i>)	6	3	50,0	12–318
Медведь бурый (<i>Ursus arctos</i>) Brown bear (<i>Ursus arctos</i>)	2	0	–	–
Рысь (<i>Lynx lynx</i>) Lynx (<i>Lynx lynx</i>)	1	0	–	–
Всего/Total	262	53	20,23	–

(табл.). Инвазированными возбудителем альвеококкоза оказались 46 лисиц (23,8%), 3 енотовидные собаки (18,7%), 3 волка (50%) и одна домашняя собака (3,6%). В течение периода исследований наибольшая экстенсивность инвазии (ЭИ) цепнем плотоядных была отмечена в 2010–2011 (42,4%), 2011–2012 (37,1%) и в 2012–2013 гг. (42,1%) у лисиц и енотовидных собак (рис.). В сезоны проведения спортивной охоты 2009–2010 и 2013–2014 гг. не отмечено ни одного случая инвазирования животных цепнем. Альвеолярный эхинококкоз регулярно регистрируется в Рязанской и Владимирской областях. Интенсивность инвазии у животных различна, у лисиц она колеблется от 12 до 40 000 экземпляров цепней на голову, у енотовидных собак — от 37 до 112 экземпляров, у волков — от 12 до 318 экземпляров и домашней собаки — 19 экземпляров.

Согласно данным, полученным из Министерства природопользования и экологии Рязанской области, за последние семь лет уровень добычи обыкновенной лисицы как основного источника инвазионного начала для человека в исследуемом регионе незначительно возрос: с 2077 голов в 2010–2011 гг. до 2503 головы в 2016–2017 гг. Генетические исследования цестод *E. multilocularis*, изъятых от обыкновенных лисиц (Владимирская, Рязанская области), показали их принадлежность к азиатскому генотипу [2, 6].

Ранее, на протяжении 2002–2004 гг., были обнаружены личиночные формы возбудителя *E. multilocularis* у промежуточных хозяев — грызунов: *Ondatra zibethicus*, *Sicista betulina*, *Arvicola amphibius* и *Myodes glareolus*, отловленных в Рязанском регионе [2]. За этот период было исследовано более 427 грызуна. Экстенсивность ин-

**Рисунок. Зараженность плотоядных животных *E. multilocularis* за период 2007–2018 гг.**Figure. Contamination of carnivores the *E. multilocularis* during 2007–2018

вазии у ондатр составила 10,9%, у лесных мышей и водяных полевков — по 2,0%, а у рыжих полевков — 1,2%. Количество гидатидозных цист регистрировалось от одной до четырех в печени промежуточных хозяев.

Медицинская статистика по мониторинговому исследованию возбудителя гидатидоза *E. multilocularis* у человека в Европейской части России регистрирует единичные случаи заболевания людей альвеококкозом в Брянской, Калужской, Рязанской и Московской областях [3, 4]. Анамнез больных содержит информацию о тесном контакте с бродячими и охотничьими собаками, о сборе диких ягод и грибов, туристических походах в лес.

Собственные исследования, проведенные в 2007–2018 гг., указывают на обнаружение возбудителя альвеолярного эхинококкоза и циркуляцию его в определенных очагах Центральной

России как среди окончательных (дефинитивных), так и среди промежуточных хозяев. В проводимых биологами, охотоведами и экологами работах, направленных на регулирование численности промысловых хищных млекопитающих и грызунов, необходимо учитывать участие этих животных в формировании и поддержании очагов возбудителя альвеококкоза. Выявленный факт указывает, что Центральный регион России должен быть включен в эндемичную по альвеолярному эхинококкозу территорию.

Благодарности

Благодарим сотрудников государственных районных обществ охотников и рыболовов Владимирской и Рязанской областей за предоставление материала для научных исследований.

Список литературы/References

- Ивашкин В.М., Контримавичус В.А., Назарова В.С. Методы сбора и изучения гельминтов наземных млекопитающих. М.: Наука, 1971. 121 с. [Ivashkin V.M., Kontrimavichus V.A., Nazarova V.S. Methods of collecting and studying of helminths of land mammals. Moscow: Science, 1971. 121 p. (In Russ.)]
- Коваленко Ф.П., Перчун Н.И., Дарченкова Н.Н., Ястреб В.Б., Бессонов А.С., Черникова Е.А., Легоньков Ю.А., Мусаев Г.Х., Шатверян Г.А., Гудовский Л.М., Паршин В.Б., Андреев О.Н. Заболеваемость гидатидозами (цистным и альвеолярным) населения и сельскохозяйственных животных в Российской Федерации в 1989–2002 гг. // Труды Всероссийского НИИ гельминтологии имени К.И. Скрябина. 2005. Т. 41. С. 192–211. [Kovalenko F.P., Perchun N.I., Darchenkova N.N., Yastrebov V.B., Bessonov A.S., Chernikova E.A., Legonkov Yu.A., Musayev G.H., Shatveryan G.A., Gudovsky L.M., Parshin V.B., Andreyanov O.N. Incidence of a gidatidozama (cystic and alveolar) the population and farm animals in the Russian Federation in 1989–2002. *Trudy Vserossiyskogo NII gel'mintologii imeni K.I. Skryabina* = *Works of the All-Russian Scientific Research Institute of A Helminthology of K.I. Scriabin*, 2005, vol. 41, pp. 192–211. (In Russ.)]
- О заболеваемости эхинококкозом и альвеококкозом в Российской Федерации: письмо Роспотребнадзора от 24.12.2013 г. № 01/14780-13-32. [O zabol'evaemosti ekhinokokkozom i al'veokokkozom v Rossijskoj Federacii: pis'mo Rospotrebnadzora ot 24.12.2013. No. 01/14780-13-32]. URL: [http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1097\(05.03.2018\)](http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1097(05.03.2018)) (In Russ.)]
- Тумольская Н.И., Завойкин В.Д., Мазманян М.В., Сергиев В.П. Альвеолярный эхинококкоз в Европейской части России // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2013. № 2. С. 36–37. [Tumolskaya N.I., Zavoykin V.D., Mazmanyanyan M.V. An alveolar echinococcosis in the European part of Russia. *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni* = *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2013, no. 2, pp. 36–37. (In Russ.)]
- Ястреб В.Б., Бессонов А.С., Андреев О.Н. Методические рекомендации по лабораторной диагностике цистного (*Echinococcus granulosus*) и альвеолярного (*Echinococcus multilocularis*) эхинококкозов и гидатидозов животных // Труды Всероссийского НИИ гельминтологии имени К.И. Скрябина. 2005. Т. 41. С. 453–462. [Yastrebov V.B., Bessonov A.S., Andreyanov O.N. Methodical recommendations about laboratory diagnostics of cystic (*Echinococcus granulosus*) and alveolar (*Echinococcus multilocularis*) of an echinococcosis and gidatidozosis of animals. *Trudy Vserossiyskogo NII gel'mintologii imeni K.I. Skryabina* = *Works of the All-Russian Scientific Research Institute of A Helminthology of K.I. Scriabin*, 2005, vol. 41, pp. 453–462. (In Russ.)]
- Konyayev S.V., Yanagida T., Nakao M., Ingovatova G.M., Shoykhet Y.N., Bondarev A.Y., Odnokurtsev V.A., Loskutova K.S., Lukmanova G.I., Dokuchaev, N.E., Spiridonov S., Alshinecky M.V., Sivkova T.N., Andreyanov O.N., Abramov S.A., Krivopalov A.V., Karpenko S.V., Lopatina N.V., Dupal T.A., Sako Y., Ito A. Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. *Parasitology*, 2013, vol. 140 (13), pp. 1637–1647. doi: 10.1017/S0031182013001340

Автор:

Андреев О.Н., д.в.н., старший научный сотрудник лаборатории гельминтозоонозов Всероссийского НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», Москва, Россия.

Author:

Andreyanov O.N., PhD, MD (Veterinary), Senior Researcher, Laboratory of Helminthozoonoses, All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants — Branch of the «Federal Scientific Center — K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.04.2019
Принята к печати 23.05.2019

Received 19.04.2019
Accepted 23.05.2019

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

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

Размеры иллюстраций:

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

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

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

Плата за публикацию статей

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

Подготовка статей

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

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

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

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

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

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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аминов Р.Ф.	167	Зорина В.Н.	49	Микрюкова Т.П.	159	Терещенко С.Ю.	180
Андреев Ю.Ю.	137	Иваненко А.В.	90	Михайлова Ю.М.	90	Терновой В.А.	159
Андреев О.Н.	193	Иванова О.Е.	90	Морозова Н.С.	90	Тихонова И.А.	129
Байкова О.Ю.	90	Ильичев А.А.	73	Нарвская О.В.	26	Токаревич Н.К.	175
Бакулина А.Ю.	73	Казачинская Е.И.	73	Некрасова И.В.	64	Топтыгина А.П.	137
Белякова Н.И.	83	Карташов М.Ю.	159	Новиков В.В.	35	Тотоян Артем А.	55
Беспалова Г.И.	121	Кириллова Т.Ю.	83	Овчинникова М.В.	83	Третьяков К.А.	175
Бичучер А.М.	111	Клыкова Т.Г.	137	Орлова Е.Г.	64	Федотов Е.Р.	167
Благовидов Д.А.	129	Ковальчук И.В.	90	Панферова Ю.А.	175	Филатов Н.Н.	129
Бургасова О.А.	121	Козловская Л.И.	90	Пахомов Д.В.	129	Фрейлихман О.А.	175
Бурова Л.А.	55	Комбарова С.Ю.	111	Пигаревский П.В.	55	Фролов А.К.	167
Ваганова А.Н.	175	Корабелников И.В.	159	Полищук В.Б.	129	Хамдулаева Г.Н.	121
Васильева Г.В.	129	Короткова Е.А.	90	Попова А.Ю.	90	Хафизов К.Ф.	9
Германчук В.Г.	83	Коряушкина А.В.	145	Пьянков С.А.	73	Хромова Е.А.	129
Гладкова Л.С.	129	Костинов М.П.	129	Рогожин В.В.	83	Шавина Н.Ю.	83
Глушкова Л.И.	159	Костинова А.М.	129	Романенко Е.Н.	90	Шаньшин Д.В.	73
Гмыль А.П.	90	Краева Л.А.	121	Рыжов А.А.	129	Шапарь А.О.	175
Головина Л.И.	111	Красота А.Ю.	90	Северин Т.В.	111	Шипулин Г.А.	9
Горбунова О.Л.	64	Кривошеина Е.И.	159	Семакова А.П.	83	Ширшев С.В.	64
Данилова Е.М.	121	Кузнецов А.И.	159	Синяков А.А.	187	Шмитько А.Д.	129
Дедков В.Г.	9	Кунилова Е.С.	121	Скирда Т.А.	111	Шербаков Д.Н.	73
Евсегнеева И.В.	35	Лапштаева А.В.	35	Смердова М.А.	137	Эдгем С.Р.	111
Егорова Ю.И.	159	Ливанова Л.Ф.	83	Смирнова О.В.	187	Юнусова Р.Ю.	111
Ежлова Е.Б.	90	Локтев В.Б.	159	Смольникова М.В.	180	Яромльская М.С.	90
Еремеева Т.П.	90	Мартыненко И.Г.	111	Снегова В.А.	55	Егорова С.А.	99
Живечкова Е.А.	35	Масленникова И.Л.	64	Солдатский Ю.Л.	111	Kaftyureva L.A.	99
Журавлев П.И.	129	Мацвай А.Д.	9	Сперанская А.С.	9	Kuleshov K.V.	99
Зайнетдинова Л.Ф.	145	Медведев С.Г.	175	Старкова Д.А.	26	Matveeva Z.N.	99
Зеткин А.Ю.	137	Мельников В.Г.	111	Сычев И.В.	35		
Зобова С.Н.	180	Мельникова А.А.	90	Телешева Л.Ф.	145		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адьювант	49	катепсин G	64	секвенирование	9
анальгезия	83	кислелептин	64	специфический клеточный	
анестезия	83	клебсиеллы	121	иммунитет	137
антитела	137	коллективный иммунитет	129	стрептококки	121
антитела к вирусу кори	129	корь	129, 137	терапия	49
бактерионосительство	111	лабораторные животные	83	туберкулез	35
биологически активные вещества	167	лактоферрин	49	уреаплазменная инфекция	145
биоупленки	64	лекарственная устойчивость	26	факторы патогенности	121
биоптаты аденоидов	111	лептин	64	фиколины	180
боррелии	175	макрофаги	26	хорионический гонадотропин	64
вакцинация взрослых	137	маннозосвязывающий лектин	180	хронический гастрит	187
вирулентность	26	медицинская пиявка	167	цестода	193
вирус денге	73	местный иммунитет	145	цитокнины	187
вирус Западного Нила	73	миелопероксидаза	64	эксперимент	83
вирус Зика	73	микобактериоз	26	экспериментальный стрептококковый	
вирус Кемерово	159	молекулярная генетика	9	гломерулонефрит	55
вирус клещевого энцефалита	159	морфометрические показатели тела	167	эстриол	64
вирус папилломы человека высокого		наружный генитальный		antimicrobial resistance	99
канцерогенного риска	145	эндометриоз	145	CagA штамм	180
вирусы	9, 49	неизвестная этиология	9	<i>E. coli</i>	64
генетические и фенотипические		нейтрофилы	64	<i>Echinococcus multilocularis</i>	193
маркеры вирулентности	121	нетуберкулезные микобактерии	26	Fc-фрагмент IgG	55
генетический контроль		обогащение	9	fluoroquinolones	99
вирулентности	26	обыкновенная лисица	193	<i>Haemophilus influenzae</i>	111
геномовид	175	ответные меры	90	<i>Helicobacter pylori</i>	180, 187
генотипирование	159	оценка риска	90	IgA-связывающая активность	
гены вирулентности	26	патогенность	26	стрептококка	55
гены <i>exh</i>	26	пептид	49	IgG-связывающая активность	
гены <i>mce</i>	26	перекрестное взаимодействие	73	стрептококка	55
гены <i>mtm</i>	26	подростки	180	<i>Ixodes persulcatus</i>	159
гены <i>pe/ppa</i>	26	полиморфизм генов	180	<i>Mycobacterium avium</i>	
гирудотерапия	167	полиовирус вакцинного		subsp. <i>hominissuis</i>	26
грелин	64	происхождения	90	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
грипп	49	полиовирус типа 2	90	<i>Neisseria meningitidis</i>	111
диагностика	9	полиомиелит	90	NGS	9
енотовидная собака	193	превалентность	175	nucleotide substitutions	99
иксодовый клещевой боррелиоз	175	предраковые состояния желудка	187	<i>S. Typhi</i>	99
иммунизация	90	ПЦР	9, 111, 175	SNV	99
иммунобиологические препараты	83	ПЦР-диагностика	159	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	111
иммуноферментный анализ	73, 187	рекомбинантные антигены	73	<i>Streptococcus pyogenes</i>	55, 111
инвазия	193	Республика Коми	159	typhoid fever	99
ингаляционный наркоз	83	рецепторы врожденного		UPEC	64
инфекционные заболевания	9	иммунитета	35		

Иллюстрации к статье «Значение факторов патогенности некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении их этиологической роли в развитии воспалительных процессов респираторного тракта» (авторы: Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н., Данилова Е.М., Беспалова Г.И.) (с. 121–128)

Illustrations for the article "The importance of pathogenicity factors of some *Streptococcus* spp. and *Klebsiella* spp. in determining their etiological role in the inflammatory processes of the respiratory tract" (authors: Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M., Bepalova G.I.) (pp. 121–128)

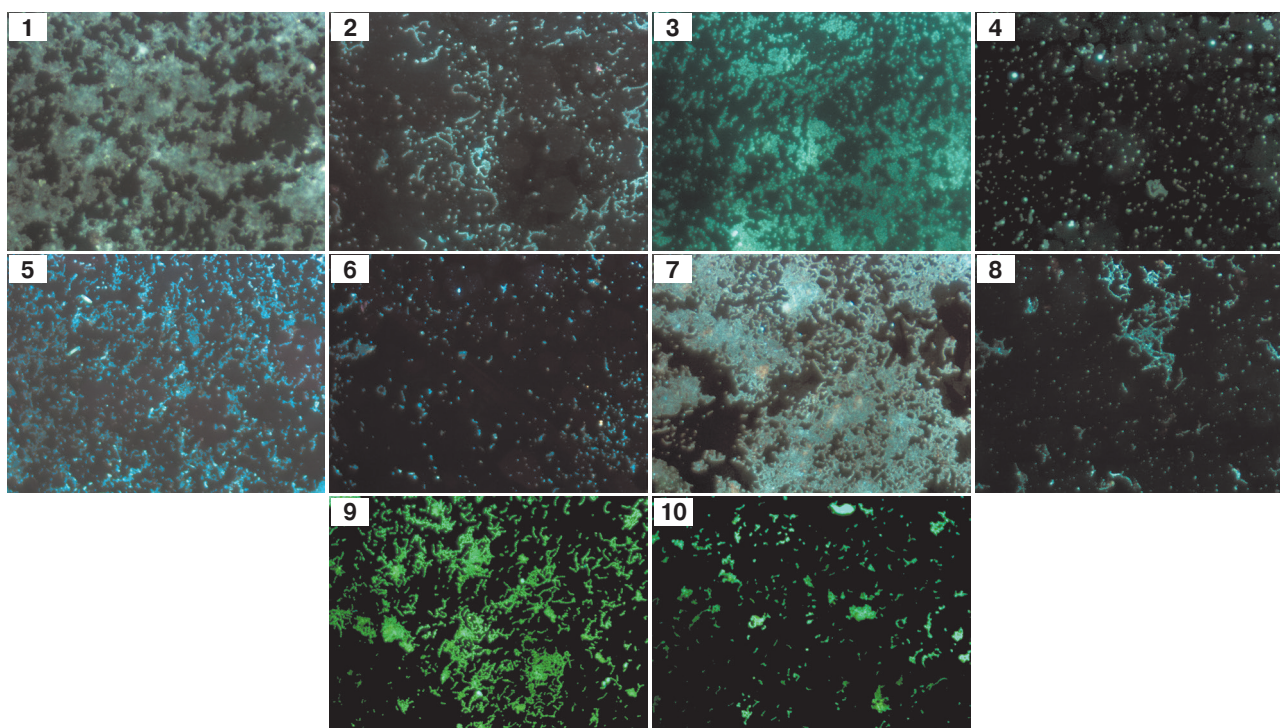


Рисунок. Люминесцентная микроскопия биопленок стрептококков (×630)

Figure. Fluorescent microscopy of streptococcal biofilms (×630)

1. *S. pyogenes*, содержащий ген *fap1*; 2. *S. pyogenes*, не содержащий ген *fap1*;
 3. *S. agalactiae*, содержащий ген *fap1*; 4. *S. agalactiae*, не содержащий ген *fap1*;
 5. *S. mitis*, содержащий ген *fap1*; 6. *S. mitis*, не содержащий ген *fap1*;
 7. *S. anginosus*, содержащий ген *fap1*; 8. *S. anginosus*, не содержащий ген *fap1*;
 9. *S. oralis*, содержащий ген *fap1*; 10. *S. oralis*, не содержащий ген *fap1*.
1. *S. pyogenes* containing the *fap1* gene; 2. *S. pyogenes* not containing the *fap1* gene;
3. *S. agalactiae* containing the *fap1* gene; 4. *S. agalactiae* not containing the *fap1* gene;
5. *S. mitis* containing the *fap1* gene; 6. *S. mitis* not containing the *fap1* gene;
7. *S. pyogenes* containing the *fap1* gene; 8. *S. anginosus* not containing the *fap1* gene;
9. *S. oralis* containing the *fap1* gene; 10. *S. oralis* not containing the *fap1* gene.

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

