

2021

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрация к статье «Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А» (авторы: И.А. Сычев, П.М. Копейкин, Е.В. Цветкова, К.В. Чередова, Б.Л. Мильман, О.В. Шамова, И.Н. Исакова-Сивак, Ю.А. Дешева) (с. 463–472)

Illustration for the article "Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes" (authors: Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A.) (pp. 463–472)

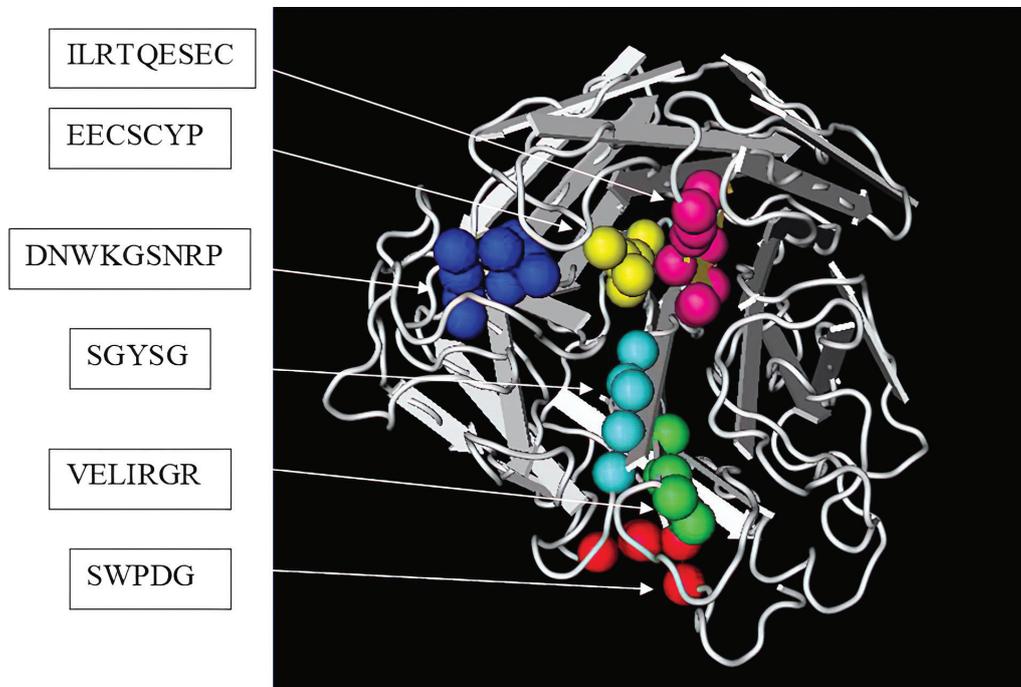


Рисунок 2. Визуализация пространственного расположения обнаруженных консервативных линейных В-клеточных эпитопов на мономере молекулы НА. Эпитопы расположены вокруг активного центра

Figure 2. Visualized spatial position of identified conservative linear B-cell epitopes on the monomer of the NA molecule. Epitopes are located around the active site

Иллюстрация к статье «Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *Escherichia coli*» (авторы: М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина) (с. 481–490)

Illustration for the article "Genetic adhesion profiles and adhesive variability of uropathogenic *Escherichia coli* strains" (authors: Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S.) (pp. 481–490)

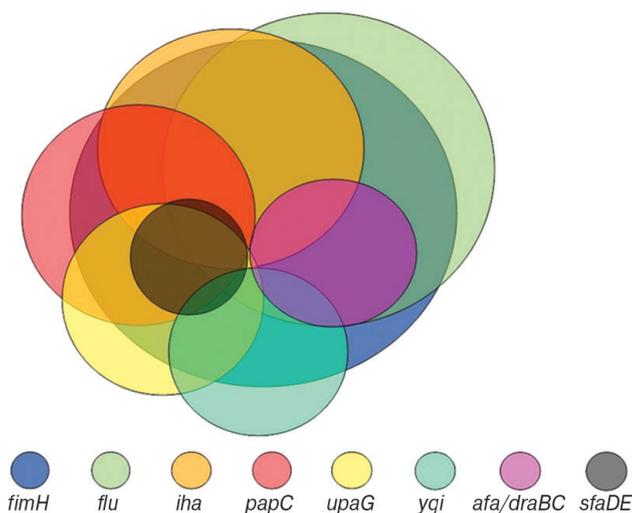


Рисунок 1. Варианты комбинаций генов адгезинов среди штаммов UPEC

Figure 1. Variants of adhesin gene combinations among UPEC strains

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

май–июнь

2021, том 11

№ 3

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
- Барбеито Л.** д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
- Брей П.** д.б.н., профессор, директор Института Пастера в Лаосе, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней, Вьентьян, Лаос
- Гинцбург А.Л.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
- Дозо Ч.** д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада
- Лаврентьева И.Н.** д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Лобзин Ю.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
- Лоузири Э.** профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис
- Львов Д.К.** д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
- Мануссакис М.** директор Института Пастера Греции, Афины, Греция
- Медуницын Н.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
- Михайлов М.И.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
- Найденски Х.** д.м.н., профессор, директор Института микробиологии им. Стефана Ангелюффа, зав. отделом инфекционной микробиологии, София, Болгария
- Онищенко Г.Г.** д.м.н., профессор, академик РАН, первый заместитель председателя Комитета Государственной Думы по образованию и науке, Москва, Россия
- Покровский В.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
- Сантони А.** зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
- Симбирцев А.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
- Тотолян Артем А.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Фрейдлини 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, научный руководитель 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, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Зуева Л.П.	д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
Кафтырева Л.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Кашкин К.П.	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
Кубарь О.И.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Малеев В.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
Нарвская О.В.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Савичева А.М.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Сельков С.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Тец В.В.	д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
Харит С.М.	д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Чекнев С.Б.	д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия
Шкарин В.В.	д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

Ответственный секретарь: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

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

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

Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Учредители

Северо-Западное отделение медицинских наук
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Санкт-Петербургу и Ленинградской области
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00578 от 26 апреля 2010 г.
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00910 от 24 июня 2011 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77–64788 от 02 февраля 2016 г.

Электронная версия журнала: www.iimmun.ru и www.elibrary.ru

С 2012 года журнал «Инфекция и иммунитет» входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

С 2014 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory

С 2016 года включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI), интегрированную с платформой Web of Science

С 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

С 2017 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Scopus

Адрес редакции:

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: (812) 233-08-58.

Издательство НИИЭМ имени Пастера

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

Типография ООО «Аллегро»

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

Подписано в печать 31.05.2021 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1150

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2021
© НИИЭМ имени Пастера, 2021
© СПб РО РААКИ, 2021

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

May–June

2021, volume 11

No. 3

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

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

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

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

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

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

Yuri V. Lobzin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Director, St. Petersburg, Russian Federation

Hechmi Louzir Professor, Institute Pasteur de Tunis, Director, Tunis, Tunisia

Dmitry K. Lvov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, 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, 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, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	PhD, MD (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Scientific Director, Moscow, Russian Federation; 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 31.05.2021. 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, 2021

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2021

© SPb RAACI, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В.

МЕЛИОИДОЗ В АСПЕКТАХ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, КЛИНИКИ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ 409

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

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПРИМЕРЕ ХЛАМИДИОЗА 423

Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Горелик Е.Ю., Скрипченко Н.В., Жирков А.А.

ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРИ ВИРУСНЫХ ЭНЦЕФАЛИТАХ И СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ У ДЕТЕЙ. II. СУДОРОЖНЫЙ СИНДРОМ 433

Ван Исмаил В.Р., Абдул Маджид М.Ш., Ли Х.Ю., Мадрим М.Ф., Абдул Рахим С.Ш.С., Джеффри М.С., Азар З.И., Гази Х.Ф., Хасан М.Р.

БЕЗОПАСНОСТЬ ВАКЦИНЫ ОТ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ (CYD-TDV) В АЗИИ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР 447

Оригинальные статьи

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

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА 454

Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Чередова К.В., Мильман Б.Л., Шамова О.В., Исакова-Сивак И.Н., Дешева Ю.А.

ИНДУКЦИЯ ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНСЕРВАТИВНЫМИ ЛИНЕЙНЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЭПИТОПАМИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А 463

Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Эргешов А.Э., Еремеев В.В.

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ 473

Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ АДГЕЗИИ И АДГЕЗИВНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* 481

Шауи И., Тауди С., Удгири А., Бенамор Д., Буркади Д., Эль Мзибри М.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ВЕРИФИКАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПЛЕВРИТА В МАРОККО 491

Вязовая А.А., Лебедева И.А., Ушакова Н.Б., Павлов В.В., Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ *Mycobacterium tuberculosis* В ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ – РЕГИОНЕ С НИЗКОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬЮ ТУБЕРКУЛЕЗОМ 497

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВОГО ШТАММА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KP254 КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ВЕТКИ ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ 506

Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Наврузова Л.Н., Малеев В.В.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ВЗРОСЛЫХ, БОЛЬНЫХ КОРЬЮ, И ПРИВИТЫХ ОТ ЭТОЙ ИНФЕКЦИИ 517

Кригер Е.А., Самодова О.В.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К КОРИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ 523

Нероев В.В., Кричевская Г.И., Алаторцева Г.И., Рябина М.В., Сарыгина А.П., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Лухверчик Л.Н.

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ IgG-АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ БЕЛКАМ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЛАЗ (ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ И ЦЕНТРАЛЬНОЙ СЕРОЗНОЙ ХОРИОРЕТИНОПАТИИ) 530

Мальцева Н.В., Викторова И.Б., Казанцева О.М., Архипова С.В., Ханин А.Л.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ И ПРЕДИКЦИЯ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ КОИНФЕКЦИИ ВИЧ И ТУБЕРКУЛЕЗА	539
---	-----

Бокач О.М., Мурашева М.С., Селькова М.С., Сторожева К.В., Чепанов С.В., Сельков С.А.

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТИВОМИКРОБНЫЙ, ПРОТИВОПРОТОЗОЙНЫЙ, ПРОТИВОГРИБКОВЫЙ И ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫЙ КОМПОНЕНТЫ, НА СОСТОЯНИЕ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ И ВАГИНИТОМ	549
---	-----

Перепелица С.А., Перминова Л.А., Степанян И.А., Захар Е.В.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ (УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)	556
--	-----

Краткие сообщения

Епифанцева Н.В., Витковский Ю.А., Емельянова А.Н.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ	565
--	-----

Цуканов В.В., Горчилова Е.Г., Коленчукова О.А., Гвоздев И.И., Савченко А.А., Васютин А.В., Тонких Ю.Л., Ржавичева О.С., Борисов А.Г.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИЕЙ <i>OPISTHORCHIS FELINEUS</i> С КОЖНЫМ СИНДРОМОМ	570
---	-----

Любимова А.В., Злоказов М.Д., Иванова Л.А., Арзамасцева Л.Ю., Рыжман Н.Н., Колосовская Е.Н., Гумилевская О.П.

СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КОРИ В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ	577
---	-----

Гончаров А.Е., Соломенный А.П., Панин А.Л., Григорьев С.Е., Чепрасов М.Ю., Ахременко Я.А., Колоджиева В.В., Гончаров Н.Е., Краева Л.А.

ОЦЕНКА ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА СЕРРАЦИЙ ИЗ КРИОГЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЙ	585
---	-----

Методы

Сиволодский Е.П., Зуева Е.В.

СПОСОБ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ <i>ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS</i>	591
---	-----

Правила для авторов	597
----------------------------------	-----

Авторский указатель	600
----------------------------------	-----

Предметный указатель	600
-----------------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V.

MELIOIDOSIS IN ASPECTS OF EPIDEMIOLOGY, CLINIC, AND LABORATORY DIAGNOSTICS 409

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

PATHOGENIC CHARACTERISTICS OF INTRACELLULAR INFECTION IN CHLAMYDIOSIS 423

Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Gorelik E.Y., Skripchenko N.V., Zhirkov A.A.

CYTOKINES AND NEURO-SPECIFIC PROTEINS IN VIRAL ENCEPHALITIS AND CONVULSIVE SYNDROME IN CHILDREN. II. CONVULSIVE SYNDROME 433

Wan Ismail W.R., Abdul Majid M.Sh., Li H.Y., Madrim M.F., Abdul Rahim S.Sh.S., Jeffree M.S., Azhar Z.I., Ghazi H.F., Hassan M.R.

SAFETY OF DENGUE VACCINE (CYD-TDV) IN ASIA: A SYSTEMATIC REVIEW 447

Original articles

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

FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD B-CELL SUBSET PHENOTYPE ARE ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOME OF WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS 454

Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A.

INDUCTION OF CROSS-REACTIVE ANTIBODIES IN MICE IMMUNIZED WITH CONSERVED INFLUENZA A VIRUS NEURAMINIDASE-DERIVED LINEAR B-CELL EPITOPES 463

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A., Yermeev V.V.

SAPOSIN D ACTING ON MACROPHAGE BACTERIOSTATIC FUNCTION IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION 473

Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S.

GENETIC ADHESION PROFILES AND ADHESIVE VARIABILITY OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS 481

Chaoui I., Taoudi S., Oudghiri A., Benamor J., Bourkadi J., El Mzibri M.

MOLECULAR DIAGNOSTICS FOR VERIFICATION OF PLEURAL TUBERCULOSIS IN MOROCCO 491

Vyazovaya A.A., Lebedeva I.A., Ushakova N.B., Pavlov V.V., Gerasimova A.A., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V.

MOLECULAR AND GENETIC ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* POPULATION IN THE VOLOGDA REGION WITH LOW TUBERCULOSIS INCIDENCE 497

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF THE CARBAPENEM RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KP254 STRAIN AS A REPRESENTATIVE OF THE HIGHLY VIRULENT STRAIN EVOLUTIONARY BRANCH 506

Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Navruzova L.N., Maleev V.V.

COMPARING HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN ADULT MEASLES PATIENTS AND MEASLES VACCINATED SUBJECTS 517

Krieger E.A., Samodova O.V.

MEASLES HUMORAL IMMUNITY IN HEALTH-CARE WORKERS 523

Neroev V.V., Krichevskaya G.I., Alatoritseva G.I., Ryabina M.V., Sarygina A.P., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Lukhverchik L.N.

FEATURES OF IgG-ANTIBODIES PRODUCTION TO INDIVIDUAL CYTOMEGALOVIRUS PROTEINS IN VARIOUS EYE DISEASES (AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY) 530

Maltseva N.V., Viktorova I.B., Kazantseva O.M., Arkhipova S.V., Khanin A.L.

IMMUNOGLOBULINS AND PREDICTED MORTALITY IN CLINICAL COURSE OF CONCOMITANT HIV AND TB INFECTION	539
---	------------

Bokach O.M., Murasheva M.S., Selkova M.S., Storozheva K.V., Chepanov S.V., Selkov S.A.

AN IMPACT OF THE COMBINED DRUG CONTAINING ANTIMICROBIAL, ANTIPROTOZOAL, ANTIFUNGAL AND GLUCOCORTICOID AGENTS ON LOCAL IMMUNITY IN WOMEN WITH BACTERIAL VAGINOSIS AND NON-SPECIFIC VAGINITIS	549
--	------------

Perepelitsa S.A., Perminova L.A., Stepanyan I.A., Zakhar E.V.

SPLENIC MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS (ULTRASONIC STUDY)	556
--	------------

Short communications

Epifantseva N.V., Vitkovsky Y.A., Emelyanova A.N.

POLYMORPHISM OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN ACUTE INTESTINAL INFECTIONS	565
---	------------

Tsukanov V.V., Gorchilova E.G., Kolenchukova O.A., Gvozdev I.I., Savchenko A.A., Vasyutin A.V., Tonkikh J.L., Rzhavicheva O.S., Borisov A.G.

METABOLIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH <i>OPISTHORCHIS FELINEUS</i> INVASION AND SKIN SYNDROME	570
--	------------

Liubimova A.V., Zlokazov M.D., Ivanova L.A., Arzamastseva L.Yu., Ryzhman N.N., Kolosovskaya E.N., Gumilevskaya O.P.

IMMUNITY TO MEASLES VIRUS IN DIVERSE POPULATION GROUPS	577
---	------------

Goncharov A.E., Solomenny A.P., Panin A.L., Grigorjev S.E., Cheprasov M.Yu., Akhremenko Ya.A., Kolodzhieva V.V., Goncharov N.E., Kraeva L.A.

ASSESSING <i>SERRATIA</i> spp. PATHOGENIC POTENTIAL FROM CRYOGENIC HABITATS	585
--	------------

Methods

Sivolodskii E.P., Zueva E.V.

METHOD FOR PHENOTYPIC IDENTIFICATION OF <i>ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS</i> BACTERIA	591
---	------------

Instructions to Authors	597
--------------------------------------	------------

Author index	600
---------------------------	------------

Subject index	600
----------------------------	------------

МЕЛИОИДОЗ В АСПЕКТАХ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, КЛИНИКИ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

И.Б. Захарова, А.В. Топорков, Д.В. Викторов

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Резюме. Мелиоидоз — тяжелое инфекционное заболевание людей и животных, против которого в настоящее время не существует эффективной вакцины. Возбудитель мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* — сапрофит, входящий в состав микробиоты влажных почв тропических и субтропических стран. Наблюдается значительный рост количества завозных случаев мелиоидоза в страны умеренного климата. Заражение мелиоидозом преимущественно происходит чрескожно, аэрогенно и при употреблении контаминированной воды. Описаны отдельные случаи вертикальной, половой, зоонозной и нозокомиальной передачи мелиоидоза. Предрасполагающими к развитию инфекции факторами в эндемичных странах являются возраст старше 45 лет, сахарный диабет 2 типа, алкоголизм, заболевания печени, хронические заболевания легких, почек и талассемия, а также длительное применение стероидов и иммуносупрессивной терапии. Достоверно подтвержденного влияния сопутствующих заболеваний на развитие мелиоидоза у путешественников не обнаружено — предрасполагающие факторы имели менее 50% заболевших. Инкубационный период заболевания варьирует в пределах 21 дня (в среднем 9 дней), при высокой инфицирующей дозе имеет продолжительность менее суток, но может быть и весьма длительным. Постинфекционного иммунитета нет, возможно повторное заражение. *B. pseudomallei* обладает обширным набором факторов вирулентности, позволяющим успешно избегать врожденного иммунного ответа хозяина, выживать и размножаться в широком диапазоне клеток, включая фагоцитирующие, что в совокупности с целым рядом других факторов определяет высокий уровень летальности мелиоидоза. Для острой формы мелиоидоза характерны пневмония, множественные абсцессы, бактериемия и системный сепсис. Лечение длительное, включает внутривенный и пероральный курсы антибиотиков. *B. pseudomallei* устойчив к пенициллинам, первому и второму поколению цефалоспоринов, аминогликозидам, макролидам, хлорамфениколу, фторхинолонам, тетрациклинам, триметоприму, а в некоторых случаях и ко-тримоксазолу и редко к цефтазидиму. Ранняя диагностика и надлежащее лечение имеют решающее значение для уменьшения ведущих к высокой смертности серьезных осложнений и предотвращения рецидивов заболевания. Однако мелиоидоз не имеет патогномичных признаков, и это заболевание мало известно врачам и микробиологам. Выделение культуры *B. pseudomallei* из любого клинического образца является диагностическим. Колонии возбудителя выглядят как посторонняя микрофлора и часто выбрасываются как не имеющие клинического значения. Результаты серологических тестов на выявление антител к возбудителю мелиоидоза неоднозначны. Выявление антигенов лимитировано бактериальной нагрузкой в исследуемом образце. Из ускоренных методов выявления возбудителя мелиоидоза и его идентификации наибольшей чувствительностью и специфичностью обладает ПЦР. Автоматическая идентификация с использованием микробиологических анализаторов обычно дает хорошие результаты, но около 15% изолятов идентифицируются неверно. Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией точно идентифицирует практически все штаммы при дополнении базы данных эталонными спектрами для *B. pseudomallei*.

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, эпидемиология мелиоидоза, сепсис, пневмония, антибиотикорезистентность, лабораторная диагностика.

Адрес для переписки:

Захарова Ирина Борисовна
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (844) 237-33-65.
E-mail: zib279@gmail.com

Contacts:

Irina B. Zakharova
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (844) 237-33-65.
E-mail: zib279@gmail.com

Для цитирования:

Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз в аспектах эпидемиологии, клиники и лабораторной диагностики // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 409–422. doi: 10.15789/2220-7619-MIA-1584

Citation:

Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Melioidosis in aspects of epidemiology, clinic, and laboratory diagnostics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 409–422. doi: 10.15789/2220-7619-MIA-1584

MELIOIDOSIS IN ASPECTS OF EPIDEMIOLOGY, CLINIC, AND LABORATORY DIAGNOSTICS

Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Melioidosis is a life-threatening infection caused by *Burkholderia pseudomallei*, an environmental Gram-negative bacterium, inhabitant of moist soils in the tropics and subtropics. There is no licensed vaccine against melioidosis. The main routes of *B. pseudomallei* infection are percutaneous inoculation, inhalation, or ingestion. Individual cases of vertical, sexual, zoonotic, and nosocomial transmission of melioidosis are described. Risk factors for infection are contact with soil or water (especially during the rainy season). The age over 45, type 2 diabetes, alcoholism, liver disease, chronic lung disease, chronic renal disease, and thalassemia, as well as long-term use of steroids and immunosuppressive therapy, are the main susceptibility factors for melioidosis. Among the affected adult residents of endemic regions, 80% had one or more predisposing factors, among children — about 20%. No significant influence of concomitant diseases on the development of melioidosis in travelers was found. Less than 50% of patients had predisposing factors. The incubation period of melioidosis ranges within 1–21 days; on average, 9 days, in case of sizeable infectious dose, it can be less than one day. There is no post-infectious immunity, and reinfection can occur with a different *B. pseudomallei* strain after successful treatment. *B. pseudomallei* is a facultative intracellular pathogen that can invade and multiply inside a wide range of cells, including phagocytic. The acute form of melioidosis is characterized by pneumonia, multiple abscesses, bacteremia, and systemic sepsis. Chronic, subacute, and latent forms are also possible. Antimicrobial therapy is divided into the initial intensive phase and the subsequent eradication phase. *B. pseudomallei* is resistant to penicillins, first- and second-generation cephalosporins, aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol, fluoroquinolones, tetracyclines, trimethoprim, and in some cases to co-trimoxazole, and rarely to ceftazidime. Early diagnosis and appropriate management are crucial in reducing severe complications leading to high mortality, and in preventing disease recurrences. However, there is no pathognomonic melioidosis-specific feature, and the disease is not well known to physicians and microbiologists. The results of serological tests for detection of specific antibodies are ambiguous. The bacterial load of the tested sample limits the detection of antigens. Among the accelerated methods for identifying the causative agent of melioidosis, PCR has the highest sensitivity and specificity. Automated identification using microbiological analyzers generally shows good results, but about 15% of isolates are misidentified. Time-of-flight mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption ionization is potentially useful for rapid identification of *B. pseudomallei*. However, existing databases require optimization by adding the reference spectra for *B. pseudomallei*.

Key words: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, epidemiology of melioidosis, sepsis, pneumonia, antibiotic resistance, laboratory diagnostics.

Введение

Мелиоидоз — потенциально смертельное инфекционное заболевание людей и животных, против которого в настоящее время не существует эффективной вакцины. Для острой формы мелиоидоза характерны абсцедирование, различная степень вовлеченности в патологический процесс многих органов, бактериемия и системный сепсис. Другими клиническими проявлениями мелиоидоза являются хроническое или подострое заболевание и скрытая инфекция с последующей активацией. По оценочным данным в мире от мелиоидоза ежегодно погибает около 89 000 человек, что существенно выше, чем от лихорадки денге [37].

Возбудитель мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* — сапрофитическая по своей природе бактерия, входящая в состав микробиоты ризосферы и значительно более глубоких слоев влажных почв эндемичных регионов мира. При этом она является универсальным патогеном, способным колонизировать растения, грибы и вызывать инфекцию у представителей практически всех классов позвоночных, включая человека, которые, наряду с почвой и водой, являются резервуаром и источником инфекции [20, 34, 51, 67].

Высокая природная резистентность *B. pseudomallei* к различным группам антибиотиков, включая цефалоспорины I и II поколений, пенициллины, рифамицины, аминогликозиды, полимиксины, а также относительная устойчивость к хинолонам и макролидам ограничивает терапевтические возможности для лечения мелиоидоза [16]. Возбудитель мелиоидоза обладает тропизмом к широкому кругу клеток и способностью избегать врожденного иммунного ответа хозяина, что в совокупности с целым рядом других факторов определяет высокий уровень летальности мелиоидоза, составляющий 10–50%, у выживших в 5–28% случаев наблюдаются рецидивы [50, 67]. При лечении неэффективными противомикробными препаратами показатели летальности могут превышать 70% [39], с развитием сепсиса — до 90% даже при адекватной терапии [23, 25]. Однозначных доказательств развития эффективного постинфекционного иммунитета нет, после успешного лечения мелиоидоза может произойти повторное заражение другим штаммом *B. pseudomallei* [50].

В последние два десятилетия в мире наблюдается растущее внимание к проблеме мелиоидоза. Интенсификация фундаментальных исследований биологических особенностей возбудителя,

разработка новых методов и средств диагностики инфекции, рандомизированные исследования эффективности противомикробных препаратов позволили снизить летальность инфекции до менее 10% при условии наличия ресурсов для быстрой диагностики, раннего применения эффективных при мелиоидозе антибиотиков и проведения интенсивной терапии.

В настоящем обзоре кратко изложены основные вопросы эпидемиологии, спектр клинических проявлений заболевания и особенности лабораторной диагностики мелиоидоза, а также некоторые характеристики *B. pseudomallei*, связанные с его патогенными свойствами.

Краткий исторический очерк

Впервые инфекция была описана А. Whitmore и С.С. Krishnaswami как «септикопиемия морфинистов» в Рангуне (Бирма) с патоморфологической картиной, сходной с сепсисом: казеозная консолидация легких, абсцессы в печени, селезенке, почках и подкожных тканях. Они же впервые изолировали возбудитель, по своим свойствам очень схожий с сапным микробом, но вновь выделенная бактерия оказалась подвижной и была названа *Bacillus pseudomallei* [66]. Впоследствии А. Stanton и W. Fletcher предложили для инфекции название Melioidosis (от греческого *melis* — сап (чума ослов), *oidēs* — сходство и *osis* — суффикс, указывающий на заболевание) [54].

Первые данные о вероятном сапрофитном существовании *B. pseudomallei* были получены в 1937 г. в Ханое М. Vaucel, выделившим культуру возбудителя от морской свинки, наочно зараженной водой из пруда. В 1955 г. L. Chambon выделил *B. pseudomallei* непосредственно из воды рисовых полей, а Н. LeClerc и P. Sureau годом позже показали присутствие специфических для палочки Уитмора бактериофагов в пробах застойных вод, отобранных в Ханое [3]. Таким образом, к середине прошлого века стало очевидно, что возбудитель мелиоидоза является почвенной бактерией.

Систематическое положение возбудителя в процессе его изучения неоднократно изменялось. Бактерию переносили из одного таксона в другой: *Bacillus whitmori*, *Malleomyces pseudomallei*, *Loefflerella pseudomallei*, *Pfeifferella whitmori*, *Pseudomonas pseudomallei*. С 1992 г. *B. pseudomallei* относится к роду *Burkholderia* [69].

Эпидемиология

До недавнего времени считалось, что распространенность мелиоидоза ограничена отдельными регионами Юго-Восточной Азии и Северной Австралии. Однако в последнее десятилетие

установленные границы эндемичности значительно расширились и на данный момент охватывают территории 48 стран, расположенных между 30-ми параллелями всех континентов. Кроме того, вероятно, мелиоидоз является эндемическим для еще 34 стран, в которых до сих пор не было подтвержденных случаев [37]. Скорее всего, расширение зоны эндемичности связано с улучшением диагностики инфекции и, как следствие, обнаружением *B. pseudomallei* во внешней среде, где бактерия к тому времени уже обитала неопределенно долго. Также нельзя исключать влияние глобального потепления на расширение границ естественного ареала возбудителя [23].

Являясь сапрофитом, возбудитель мелиоидоза хорошо адаптирован к разнообразным стрессовым условиям среды обитания. Он способен выживать при ограничении питательных веществ, более того, Г.М. Ларионовым и соавт. показан логарифмический характер роста бактерии в первые двое суток в дистиллированной воде [4]. *B. pseudomallei* 16 лет сохраняла жизнеспособность в дистиллированной воде при температуре около 25°C [47]. Микроб быстро приспосабливается к недостатку кислорода, а также воздействию высоких концентраций солей [31]. *B. pseudomallei* активно размножается в диапазоне температур от 25 до 42°C. В лабораторных условиях большинство исследованных штаммов выживали в физиологическом растворе при 5°C более 160 дней [70], не менее 90 дней сохраняли жизнеспособность при 1°C и не менее 25 суток при температуре –18°C [1]. Возбудитель может переживать кратковременное (до одного часа) воздействие 50°C [59].

Мелиоидоз встречается у людей всех возрастов, максимум заболеваемости в эндемичных регионах наблюдается в возрастной группе от 40 до 60 лет. Считается, что заражение мелиоидозом преимущественно происходит при чрескожном проникновении возбудителя, и наибольшему риску подвержены лица, деятельность которых так или иначе связана с контактом с почвой. Относительно недавно опубликовано исследование, свидетельствующее о возможности аэрозолизации *B. pseudomallei* из почвы в штормовых условиях. Приведены молекулярно-генетические доказательства эпидемиологической связи между воздушными и почвенными штаммами *B. pseudomallei*, выделенными через 6 недель после госпитализации больного из внешней среды в месте предполагаемого заражения, и инфекцией пациента. Изоляты из внешней среды и клинический штамм имели общий сиквенс тип, вошли в одну группу по результатам анализа варибельного числа tandemных повторов и различались всего тремя однонуклеотидными заменами при

сравнении полногеномных последовательностей [24]. Доля случаев ингаляционного мелиоидоза существенно варьирует в зависимости от места и времени года. Отмечена корреляция между числом заразившихся и среднемесячным количеством осадков — максимум заболеваемости в эндемичных странах ежегодно приходится на влажный сезон и снижается в сухой [10, 12, 55, 71]. Аэрогенное заражение или инфицирование в результате аспирации связано с более коротким инкубационным периодом и более высоким риском развития септического шока и смерти, что, возможно, обусловлено не только спецификой входных ворот инфекции, но и более высокой инфицирующей дозой. Более распространенным, чем считалось ранее, является заражение при употреблении воды из хлорированных (или хлорированных недостаточно) источников водоснабжения или при заглатывании речной воды. Описаны отдельные случаи вертикальной и половой передачи, зоонозной передачи мелиоидоза от больных животных, а также случаи нозокомиальной передачи инфекции [26].

Инкубационный период заболевания может быть весьма длительным, но в основном варьирует в пределах 21 дня (в среднем симптомы инфекции проявляются в течение 9 дней), при высокой инфицирующей дозе может составлять даже менее суток.

Анализ заболеваемости на эндемичных территориях свидетельствует о значительном влиянии на развитие инфекционного процесса ряда сопутствующих заболеваний. Наиболее распространенным фактором предрасположенности к мелиоидозу является сахарный диабет 2 типа — у людей с сахарным диабетом риск развития мелиоидоза увеличивается в 12 раз в сравнении со здоровыми. Другие известные факторы включают чрезмерное употребление алкоголя, заболевания печени, хронические заболевания легких, почек и талассемию, а также длительное использование стероидов и иммуносупрессивной терапии. Тем не менее более 80% педиатрических и около 20% взрослых пациентов не имели вышеперечисленных факторов риска [69].

В последние десятилетия регистрируется возрастающее количество завозных случаев мелиоидоза в страны умеренного климатического пояса. Преобладающим регионом заражения по-прежнему остается Юго-Восточная Азия, увеличивается число импортированных случаев из Мексики, стран Южной Америки и Карибского бассейна, Восточной Африки, Мадагаскара, Океании, Китая и Индии — т. е. регионов, относящихся к популярным туристическим направлениям. В отличие от автохтонного населения, у путешественников риск развития инфекции не имеет очевидной корреля-

ции с наличием сопутствующих заболеваний — менее 50% заболевших путешественников имели предрасполагающие заболевания. Кроме того, прослеживается тенденция снижения среднего возраста заболевших туристов [2, 35].

Степень тяжести и клинические проявления мелиоидоза зависят от дозы и способа заражения, общего состояния организма пациента, и свойств самого штамма.

Генетическая гетерогенность

B. pseudomallei

Возбудитель мелиоидоза обладает обширным геномом, представленным двумя неравнозначными кольцевыми хромосомами, размеры которых у разных штаммов варьируют в пределах 3,8–4,23 млн пар нуклеотидов (м.п.н.) для большой хромосомы и 3,07–3,38 м.п.н. — для малой, что определяет существенную межштамбовую генетическую гетерогенность в рамках видового пангенома. Выявлены некоторые геномные различия, которые, возможно, связаны с вариациями вирулентности у разных штаммов, причем наиболее вирулентным оказался штамм с наименьшим размером генома [13].

Ядро основного генома — т. е. гены, обнаруженные у 99% штаммов, — составляет 74% от общего количества генов. Ведущим механизмом генетической диверсификации возбудителя является горизонтальное приобретение генов, в том числе благодаря способности *B. pseudomallei* к естественной трансформации [7]. Варибельная часть генома преимущественно представлена геномными островами, составляющими в среднем около 6% его протяженности [8, 52, 56]. Приобретение дополнительного генетического материала, как полагают, является основой значительных адаптационных возможностей *B. pseudomallei*, позволяющих микробу занимать самые разнообразные экологические ниши — от почвы до млекопитающих. Филогенетическое разнообразие *B. pseudomallei*, по-видимому, определяют процессы гомологичной рекомбинации, происходящие по всему геному, что приводит к аллельному полиморфизму генов, включая консервативные, при наблюдаемом сохранении порядка их расположения на хромосомах [53].

Филогеографическая реконструкция, основанная на комплексном анализе представительного количества полногеномных последовательностей штаммов различного географического происхождения, подтвердила гипотезу австралийского происхождения *B. pseudomallei* и продемонстрировала четкие различия между изолятами из Австралии и Азии и азиатский корень клады африканских и американских штаммов [19].

Факторы вирулентности и резистентность к антибиотикам

Возбудитель мелиоидоза обладает чрезвычайно большим набором факторов вирулентности и естественной устойчивостью к широкому спектру противомикробных препаратов.

Геном возбудителя содержит более ста детерминант с доказанной функцией факторов вирулентности (и значительно больше предполагаемых), наиболее значимые из которых кластеры генов систем секреции II, III, IV, V и VI типов, кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида, гены, ответственные за биосинтез липополисахаридов (ЛПС). Компоненты перечисленных систем секреции обеспечивают возбудителю мелиоидоза адгезию, инвазию и избегание фагоцитоза, внутриклеточное выживание, актин-зависимую подвижность и формирование у хозяина гигантских многоядерных клеток. ЛПС и полисахаридная капсула обеспечивают устойчивость *B. pseudomallei* к воздействию комплемента, а также лизосомальным дефензином и катионным пептидам, благодаря чему возбудитель выживает в сыворотке крови и способен проникать и размножаться в клетках млекопитающих, включая фагоцитирующие [48]. У возбудителя мелиоидоза описано три серотипа ЛПС (А, В и В2), причем серотип А является наиболее распространенным, серотипы В и В2 обнаружены преимущественно у австралийских штаммов [57]. Исследование, посвященное анализу клинических проявлений и исходов случаев инфекции, обусловленных штаммами с ЛПС типов А и В, показало сходные уровни летальности (12 и 12%), сопоставимую частоту бактериемии (57 и 53%) и септического шока (22 и 18%) [63], что свидетельствует о равнозначности указанных типов ЛПС в патогенезе инфекции. У возбудителя мелиоидоза обнаружен мощный цитотоксин — BLF1 (*Burkholderia lethal factor 1*), сходный с цитотоксическим некротизирующим фактором 1 *Escherichia coli*. BLF1 необратимо ингибирует инициацию трансляции в эукариотических клетках, инактивируя фактор инициации EIF4A [21]. *B. pseudomallei* продуцирует протеазы, липазы, лецитиназу, каталазу, пероксидазу, супероксиддисмутазу, гемолизин, цитотоксический экзолипид, сидерофор, жгутики, пили типа IV и другие адгезины [24].

В отличие от вариантов ЛПС, для некоторых других факторов вирулентности, имеющих варианты паралоги или вариабельность присутствия в геноме, показана связь со специфическими проявлениями мелиоидоза. Так, все штаммы *B. pseudomallei* кодируют *VimA* — фак-

тор внутриклеточной подвижности, являющийся автотранспортером T5SS, однако примерно 12% австралийских штаммов обладают вариантом *bimA*, который на 95% гомологичен ортологу *B. mallei* (*bimA_{Bm}*) и имеет только 54% гомологии с *bimA_{Bp}*, и оба варианта обеспечивают способность полимеризации актина. Вариант *bimA_{Bm}* еще не наблюдался в штаммах из Юго-Восточной Азии. Было показано, что наличие в геноме *B. pseudomallei* аллеля *bimA_{Bm}* ассоциировано с проявлением неврологического мелиоидоза в форме энцефаломиелита. Напротив, у пациентов, инфицированных *B. pseudomallei* с вариантом *bimA_{Bp}*, частота развития пневмонии была в 2 раза выше чем у пациентов, инфицированных штаммами с вариантом *bimA_{Bm}* [49].

У всех штаммов *B. pseudomallei* имеется основной нитевидный гемагглютинин FhaB, кроме того, дополнительно есть три вариабельно присутствующих локуса, кодирующих три варианта FhaB (1, 2 и 3), из которых штаммы *B. pseudomallei* могут содержать один, два или все три варианта гена *fhaB*. У пациентов, инфицированных *fhaB3*-позитивными штаммами, бактериемия наблюдается в два раза чаще. Штаммы *B. pseudomallei*, лишенные *fhaB3*, значительно реже вызывают тяжелые формы инфекции и, возможно, что *fhaB3* в сочетании с другими факторами вирулентности способствует неблагоприятному исходу мелиоидоза [49].

Необходимо отметить, что приведенный перечень факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза является далеко не полным: в качестве примеров перечислены лишь избранные факторы с хорошо доказанной ролью в патогенезе инфекции.

B. pseudomallei обладает высоким уровнем устойчивости к большинству антибиотиков, обычно используемых при лечении бактериального сепсиса [67]. К настоящему времени у нее описаны практически все известные бактериальные механизмы избегания ингибирующего воздействия антибиотиков, доминирующим среди которых является активное выведение антибиотика из клетки — эффлюкс, определяющий устойчивость к аминогликозидам, макролидам, хлорамфениколу, фторхинолонам, тетрациклинам, триметоприму, а в некоторых случаях и котримоксазолу и β-лактамам [46, 61]. Основным механизмом устойчивости к β-лактамам у возбудителя мелиоидоза в настоящее время считается энзиматическая инактивация, и основную роль играет гидролитическая активность β-лактамазы класса А — PenA. Исследования приобретенной во время терапии устойчивости к β-лактамам выявили три различных механизма, обусловленные мутациями *penA*:

гиперпродукция фермента, связанная с мутациями в его промоторной области [72], нечувствительность к ингибиторам и повышенная аффинность к цефтазидиму [9].

Однако имеются данные об участии в повышении уровня резистентности к антибиотикам этого класса и иных механизмов. В частности, это такие, казалось бы, противоположные механизмы, как полная утрата гена пенициллин-связывающего белка РВР 3, который является основной мишенью для цефтазидима [14], или же, наоборот, возрастание экспрессии генов РВР, включая РВР 3, т. е. гиперпродукция основной и альтернативных мишеней для антибиотика [22].

Несмотря на активные исследования, специфические механизмы вирулентности *B. pseudomallei* так до конца и не ясны. Возможно, это связано с тем, что бактерия в процессе инфекции использует свой колоссальный адаптационный потенциал к экстремальным и непредсказуемым биотическими и абиотическими проблемами, возникающим при сапрофитическом существовании, а млекопитающие для нее являются лишь одной из сред обитания.

Клинические формы и синдромы мелиоидоза

Полиморфизм клинических проявлений заболевания настолько велик, что даже в эндемичных регионах поставить диагноз на основании клинической картины крайне проблематично. Клинические проявления мелиоидоза могут варьировать от острой септицемии до хронической инфекции при отсутствии специфических признаков и симптомов, поскольку возбудитель способен поражать практически любые органы и ткани. В связи с этим дифференциация между мелиоидозом и другими острыми и хроническими бактериальными инфекциями часто невозможна. Пациентам нередко диагностируют внебольничную пневмонию, туберкулез, вирусные лихорадки, онкологические и другие заболевания. Эмпирическое лечение при ошибочном диагнозе, как правило, неэффективно из-за устойчивости *B. pseudomallei* ко многим стандартно используемым при бактериальном сепсисе противомикробным препаратам.

Клинические формы мелиоидоза по продолжительности симптомов подразделяются на острый мелиоидоз (менее 2 недель), подострый (симптомы сохраняются между 2 неделями и двумя месяцами) и хронический (более 2 месяцев). Латентный мелиоидоз представляет собой бессимптомную инфекцию: *B. pseudomallei* присутствует в организме в течение длительного времени, никак себя не про-

являя, с возможностью пролиферации в перспективе. Рецидивом принято считать развитие новых симптомов и признаков мелиоидоза после первоначально успешной терапии, обусловленное тем же штаммом, что и первоначальная инфекция. Повторная инфекция — мелиоидоз, вызванный повторным заражением новым штаммом *B. pseudomallei* [38].

Острая форма мелиоидоза является наиболее распространенной (85%) и развивается вскоре после заражения [25]. Независимо от пути заражения острый мелиоидоз в большинстве случаев проявляется в виде локализованных или множественных абсцессов с пневмонией или без нее и часто осложняется сепсисом. Помимо этого, при мелиоидозе описаны поражения различных органов, а также отсутствие выраженного фокуса инфекции [23]. Частота рецидивов у выздоровевших пациентов, по разным оценкам, не так давно варьировала от 5% до 28% [16, 42]. С улучшением стратегии лечения количество рецидивов снизилось до менее 5% [45]. Летальность рецидивов несколько ниже, чем при первичной инфекции, и составляет 15–24% [38]. Стойкий иммунитет после перенесенного заболевания отсутствует, в связи с чем возможно реинфицирование [50].

Хронический мелиоидоз наблюдается приблизительно у 11% заболевших и может прогрессировать в течение многих месяцев или лет с периодами чередующихся ремиссий и рецидивов. Как и при острой инфекции, могут поражаться любые органы, возможна бактериемия. У большинства пациентов наблюдается лихорадка и потеря веса, а также симптомы, характерные для вовлеченного органа, например хронический кашель, хронические поражения кожи. Основной проблемой, связанной с хроническим мелиоидозом, является сложность его диагностики. Хронический мелиоидоз может имитировать многие инфекционные, в частности туберкулез, и онкологические заболевания, так что эмпирическое лечение вряд ли будет успешным. Смертность при хроническом мелиоидозе варьирует от 0% в Австралии и примерно до 25% в Таиланде [38].

Около 5% всех случаев мелиоидоза протекают в латентной форме (т. е. инфекция протекает бессимптомно, однако возбудитель в организме сохраняется) [25]. Описаны случаи латентной инфекции, длившейся несколько десятков лет, прежде чем иммуносупрессия или другие стрессовые реакции хозяина активировали бактериальную пролиферацию с развитием клинических проявлений мелиоидоза.

Латентная форма выявляется исключительно ретроспективно, когда инфекция становится клинически очевидной, иногда спустя много лет после заражения. Наиболее убедитель-

ные доказательства существования скрытого мелиоидоза представлены в отчетах о случаях мелиоидоза в эндемичных регионах. Самый длинный период между временем последнего возможного контакта с *B. pseudomallei* и развитием активного заболевания составил 62 года [26]. До настоящего времени не ясно, является ли причиной латентного мелиоидоза перенесенная и давно забытая пациентом легкая форма инфекции, или это чрезвычайно длительный инкубационный период.

Независимо от основной клинической картины для мелиоидоза характерны вторичные очаги, предположительно, вследствие гематогенного распространения инфекции — висцеральные абсцессы обычно регистрируются в селезенке, печени, надпочечниках и почках [16]. Бактериemia развивается в 55% случаев. Сепсис-ассоциированный мелиоидоз присутствует в 21% случаев с летальностью, составляющей 50–90% [25, 26].

Наиболее распространенным клиническим проявлением мелиоидоза является пневмония, на которую приходится более половины случаев среди взрослых и около 20% — у детей. Мелиоидозная пневмония с мультифокальными инфильтратами в легких может сопровождаться развитием острого молниеносного сепсиса и летальностью до 90% даже при адекватной терапии [26, 43] или переходить в хроническую форму, которая имитирует туберкулез как клинически, так и рентгенологически [65]. Мелиоидозная пневмония может быть первичной и вторичной. Вторичная пневмония распространена у пациентов с инфекцией мочеполовой системы, септическим артритом и/или остеомиелитом, а также бактериемией без явного первоначального фокуса инфекции. Второй по распространенности является мелиоидозная инфекция мочеполовой системы — абсцессы предстательной железы, почечные абсцессы, эпидидимо-орхиты, абсцессы стенки матки. Абсцессы предстательной железы могут быть как первичным, так и вторичным очагом, обычно при пневмонии. В Австралии мочеполовой мелиоидоз встречается гораздо чаще, чем в Юго-Восточной Азии. Все чаще наблюдается бактериemia без клинически очевидного фокуса, особенно у пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию [26]. Следующими по распространенности являются кожные проявления мелиоидоза — поверхностные пустулы, подкожные абсцессы и пиомиозиты могут быть основным или вторичным очагом [38]. Кожная форма мелиоидоза чаще присутствует у детей (60% случаев), чем у взрослых (13%) [41]. Кожные поражения в отдельных случаях могут прогрессировать до некротического фасциита [36, 62].

Мелиоидоз центральной нервной системы (ЦНС) представляет собой гетерогенное заболевание, которое может проявляться в виде энцефаломиелита, абсцесса мозга, изолированного менингита или изолированного экстрааксиального поражения. Общим проявлением всех видов мелиоидоза ЦНС является лихорадка свыше 39°C. Большинство случаев энцефаломиелита были зарегистрированы на севере Австралии. Доминирующим проявлением энцефаломиелита является энцефалитный синдром без миелита. Клиническая картина соответствует инфекции ствола мозга, и почти все пациенты имеют нормальное или почти нормальное начальное состояние сознания. Характерные симптомы включают одностороннюю слабость верхних двигательных нейронов, признаки поражения мозжечка, паралич VI, VII черепных нервов, бульбарный паралич [26, 29]. Могут возникать серьезные остаточные неврологические нарушения, в том числе у детей [41, 64]. Другие подтипы энцефаломиелита включают комбинированный энцефалит с миелитом и изолированный миелит. У пациентов с чистым миелитом клинические проявления поражения спинного мозга включают парапарез или квадрипарез, сопровождающиеся сенсорными нарушениями и дисфункцией кишечника. В странах Юго-Восточной Азии мелиоидоз ЦНС ассоциирован с формированием абсцесса головного мозга. Наиболее распространенным признаком является очаговый неврологический дефицит, паралич черепных нервов встречается нечасто. В отличие от абсцессов мозга, вызванных другими причинами, при мелиоидозе более распространено проявление лихорадки. Другие признаки включают головную боль, измененное сознание, ригидность затылочных мышц, судороги, одностороннюю слабость, параплегию, квадриплегию и паралич черепных нервов [68]. Уникальными характеристиками мелиоидоза ЦНС являются распространение микроабсцессов вдоль путей белого вещества и частое вовлечение тройничного нерва [33]. У пациентов, в анамнезе у которых имел место прием нейролептиков, могут присутствовать экстрапирамидные симптомы, в частности общая мышечная ригидность [15].

Мелиоидозные септические артриты/остеомиелиты могут быть как первичной, так и вторичной формой инфекции, клинические проявления могут варьировать от острого сепсиса до хронического заболевания. Очаги поражения часто локализованы в метафизарной области длинных костей или на теле позвонков. Рентгенограмма может демонстрировать эрозию кортикального слоя или кистозные изме-

нения. Поражение костей и суставов при мелиоидозе в Австралии встречается значительно реже (7,6%), чем в Северо-Восточном Таиланде (14–27%) [44].

Острый гнойный паротит часто встречается у детей в Юго-Восточной Азии, причем при отсутствии явных факторов риска, редко встречается у взрослых и ограничивается единичными случаями в Австралии. Мелиоидозный паротит может быть осложнен образованием абсцессов, разрывом слухового канала, параличом лицевого нерва и некротическим фасциитом, остеомиелитом с септическим артритом и сепсисом [28, 30, 40].

Педиатрический мелиоидоз при доступности специфического лечения в большинстве случаев имеет благоприятный прогноз, но в условиях ограниченных ресурсов при использовании более коротких протоколов лечения или ограниченной доступности эффективных при мелиоидозе антибиотиков показатели летальности резко возрастают. Так, сравнение двух ретроспективных исследований детского мелиоидоза в двух эндемичных регионах показало, что общая летальность среди детей в Северной Австралии была значительно ниже (7%) [41], чем в Камбодже — общая летальность составила 17%, а в случаях бактериемии доходила до 72% [58].

Помимо перечисленных выше клинических проявлений, были описаны случаи мелиоидоза с поражением других органов: лимфадениты, микотические аневризмы, абсцессы надпочечников, средостения, перикардит, глубокий абсцесс шеи, острый средний отит, синуситы, язвы роговицы, орбитальный целлюлит, абсцесс молочной железы и абсцесс мошонки [38].

Независимыми факторами риска смерти и неудачи лечения являются бактериемия (отношение шансов [ОШ]: 2,9), дыхательная недостаточность (ОШ: 6,7), почечная недостаточность (ОШ: 3,1) и возраст более 50 лет (ОШ: 2,0) [12].

Лечение и постконтактная профилактика (ПКП) мелиоидоза и сапа в настоящее время основаны на рекомендациях, разработанных ведущими мировыми экспертами на основании результатов серии крупных рандомизированных клинических исследований [27, 39].

Исследования принятой схемы постконтактной профилактики (ПКП) на моделях лабораторных животных показали ее недостаточную эффективность [27]. В связи с этим рекомендуется при назначении ПКП сопоставлять потенциальную пользу экстренного лечения с последствиями серьезных побочных эффектов рекомендуемого препарата первой линии — триметоприма/сульфаметоксазола (ко-тримоксазола).

Согласно рекомендациям, лечение делится на две фазы: в первой интенсивной (острой) фазе для предотвращения смерти от сепсиса назначается внутривенное введение противомикробных препаратов на 10–14 дней (или дольше, если клинически показано). В тяжелых случаях, например при септическом шоке, глубоких абсцессах, обширной инфекции легких, остеомиелите, септическом артрите или мелиоидозе ЦНС, необходимо проведение парентеральной терапии не менее 4 недель. Кроме того, для пациентов с тяжелой инфекцией рекомендуется добавлять в схему лечения триметоприм/сульфаметоксазол (ко-тримоксазол) в течение всей острой фазы. Основным препаратом в интенсивной фазе лечения является цефтазидим. Карбапенемы предназначены для тяжелых инфекций или неудач лечения, а амоксициллин/клавулановая кислота (ко-амоксиклав) является препаратом второй линии.

Во второй фазе, или стадии эрадикации, назначаются пероральные препараты в течение не менее 12 недель с целью предотвращения рецидива. Специфическое лечение для отдельных пациентов должно быть адаптировано в соответствии с клиническими проявлениями и реакцией. Предпочтительным для фазы эрадикации является ко-тримоксазол, альтернативный препарат — ко-амоксиклав. Кроме того, необходимо дренирование абсцессов, когда это возможно, и поддерживающая интенсивная терапия. Подробные рекомендации по дозировке и частоте введения препаратов доступны в Интернете [27, 39].

Диагноз. Ограничения клинической диагностики

Учитывая ограниченную осведомленность о мелиоидозе практикующих врачей вне эндемичных регионов и неспецифическую клиническую картину, установить диагноз только на основании клинических данных очень сложно. Наиболее часто больным диагностируют туберкулез, реже — широкий спектр других инфекций бактериальной (*Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Legionella*, *Brucella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia* spp., *Yersinia* spp., *Borrelia* spp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Rickettsia* spp.), вирусной (СПИД, цитомегаловирусная инфекция, вирус Эпштейна–Барр, лихорадка денге, чикунгунья), паразитарной (малярия, шистосомоз) и микотической этиологии [35].

При диагностике тяжелых инфекций с лихорадкой, абсцессами (особенно в печени, селезенке, простате), паротитами у детей или пневмонией неясной этиологии необходима настороженность в отношении мелиоидоза при

наличии у пациента истории посещения эндемичных и потенциально эндемичных стран (перечислены в источнике [37]). Для подтверждения диагноза «melioidosis» необходимы лабораторные исследования. Клиницисты должны уведомлять диагностические лаборатории о подозрении на мелиоидоз в целях проведения регламентированного объема исследований с обеспечением биобезопасности персонала.

У больных с подозрением на мелиоидоз вне зависимости от клинической формы болезни производят взятие крови, мочи, мазка слизистой зева. Кроме того, проводится отбор содержимого абсцессов, пунктатов лимфоузлов, мокроты, отделяемого язв, полостных экссудатов, цереброспинальной жидкости и др., в зависимости от клинической формы болезни. Клинические образцы следует транспортировать в лабораторию при комнатной температуре и обрабатывать как можно скорее, а мазки желательно помещать в транспортную среду.

Лабораторная диагностика

Чувствительность бактериологического метода выделения *B. pseudomallei* не превышает 60% и зависит от ряда объективных и субъективных причин, включая опыт микробиолога. Работа по выделению возбудителя мелиоидоза в Российской Федерации может проводиться только в лабораториях, имеющих разрешение на работу с возбудителями II группы патогенности (опасности). Наиболее предпочтительной средой для выделения возбудителя мелиоидоза является селективный агар Эшдауна, но в большинстве стран он коммерчески недоступен. В качестве альтернативы можно использовать агар *B. cepacia*, колумбийский агар или агар МакКонки. Необходимо учитывать невысокую скорость роста возбудителя и наблюдать посевы ежедневно на протяжении не менее чем 6 суток. В качестве накопительных сред можно использовать кровяной и триптиказо-соевый агары. Характерным признаком колоний *B. pseudomallei* на средах с кристаллвиолетом является металлический блеск, на средах без красителя — перламутровый блеск. На кровяном агаре гемолиз отсутствует, на агаре МакКонки молодые культуры бледно-розовые, при старении приобретают более яркую окраску. Для *B. pseudomallei* характерно присутствие на одной чашке разных типов колоний: в первые 24–48 часов колонии гладкие, затем начинают диссоциировать с образованием R-форм. Причем клинические штаммы преимущественно образуют шероховатые колонии, возможно также образование слизистых или мукоидных колоний. По морфологии роста

на агаризованных средах *B. pseudomallei* может быть принят за постороннюю микрофлору. Поэтому необходимо помнить о том, что любые неферментирующие, оксидазоположительные, грамотрицательные палочки, не относящиеся к *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из любого клинического образца, могут быть возбудителем мелиоидоза [32]. *B. pseudomallei* представляет собой прямые или слегка изогнутые грамотрицательные биполярные палочки с закругленными концами, размером 2–6 × 0,5–0,8 мкм. Морфология клеток возбудителя от пациентов, получавших противомикробные препараты, может быть крайне нетипичной — встречаются коккобациллярные, нитевидные и дрожжеподобные формы микроба. Биполярность может быть не выражена или отсутствовать у клеток молодых или старых культур, культивированных при дефиците питательных веществ. Для отбора подозрительных колоний полезно использовать антибиотикограмму — *B. pseudomallei*, как правило, устойчив к гентамицину и полимиксину, но чувствителен к амоксицилину/клавулановой кислоте.

Для прямого обнаружения *B. pseudomallei* в клинических образцах и для последующей идентификации выделенных культур рекомендуется использовать метод флуоресцирующих антител (МФА), реакцию непрямой геммагглютинации (РНГА) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Использование МФА и РНГА при анализе нативного материала ограничено чувствительностью методов. Бактериальная нагрузка в клинических образцах варьирует от 0,1–100 КОЕ/мл (кровь) до 10²–10⁹ КОЕ/мл (мокрота) [32], что в ряде случаев, в первую очередь при исследовании образцов крови, ниже достижимого уровня обнаружения возбудителя этими методами и ведет к получению ложноотрицательных результатов. Из ускоренных методов выявления возбудителя мелиоидоза наибольшей чувствительностью и специфичностью обладает ПЦР. При использовании двух тест-систем для выявления независимых мишеней или амплификации в мультиплексном формате, одновременно выявляющей несколько разных локусов, значительно возрастает специфичность анализа, и вероятность получения ложных результатов становится минимальной. В Российской Федерации имеются зарегистрированные диагностические наборы для выявления и идентификации возбудителя мелиоидоза всеми перечисленными методами [6, 74].

Серологические тесты, направленные на выявление антител к возбудителю мелиоидоза имеют ограниченное клиническое применение из-за ложноотрицательных результатов на ран-

них стадиях заболевания и отсутствия сероконверсии приблизительно в 30% случаев инфекции [17]. Кроме того, у местного населения эндемичных регионов наблюдается высокая серопревалентность, причем фоновый уровень антител к возбудителю мелиоидоза в разных странах сильно варьирует [11, 18, 60]. Предполагалось, что для туристов, заразившихся мелиоидозом во время краткосрочных визитов на эндемичные территории, серодиагностика является более информативным методом, чем для людей, постоянно или долгосрочно проживающих в зоне эндемичности. Однако, судя по результатам ретроспективного исследования завозных случаев мелиоидоза, диагностированных в Европе в период с 2000 по 2018 г., серодиагностика неэффективна и в этом случае — антитела были обнаружены только у 9% путешественников с подтвержденным диагнозом [35].

При использовании коммерческих систем биохимической идентификации *B. pseudomallei* приблизительно в 15% случаев возбудители мелиоидоза определяются ошибочно, чаще всего как виды комплекса *B. cepacia*, реже — как *C. violaceum*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni* и *Sphingomonas paucimobilis*. Большинство систем идентификации не дифференцирует *B. pseudomallei* от близкородственных видов, таких как *B. thailandensis* [73].

Времяпролетные масс-спектрометрические системы с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией обеспечивают быструю и точную идентификацию *B. pseudomallei* при условии дополнения баз данных референсными масс-спектрами обще клеточных белков [5], поскольку в коммерческих базах они либо отсутствуют, либо представлены только рибосомальными белками.

Заключение

Клиническая диагностика мелиоидоза сама по себе является весьма непростой задачей и многократно усложняется при недостаточной осведомленности об этой инфекции клиницистов и лабораторного персонала. Прогноз мелиоидоза во многом зависит от своевременного установленного диагноза и сроков начала эффективного лечения. В регионах, не эндемичных по мелиоидозу, эмпирическая антимикробная терапия острого сепсиса может не включать препараты, активные против *B. pseudomallei*, и вряд ли будет успешной. Последние достижения в области лабораторной диагностики значительно улучшили точную идентификацию *B. pseudomallei*, однако ошибочная идентификация с использованием автоматизированных микробиологических систем еще имеет место. Серологические тесты на выявление специфических антител могут иметь значение при диагностике лихорадочного заболевания у путешественников, которые не жили, но побывали в эндемичных регионах. Отрицательный результат не исключает мелиоидоза, но положительный результат подразумевает инфицирование *B. pseudomallei*. Развитие молекулярно-генетических технологий, включая определение полногеномных последовательностей, значительно упрощает идентификацию возбудителя, а практически повсеместная в нашей стране доступность ПЦР при необходимости позволяет своевременно его выявить. В заключение хочется еще раз подчеркнуть необходимость настороженности в отношении мелиоидоза при диагностике тяжелых инфекционных заболеваний неясной этиологии у лиц, посещавших эндемичные по мелиоидозу территории или длительно находившихся там, причем независимо от срока давности.

Список литературы/References

1. Захарова И.Б., Вуй Т.Л.А., Шпак И.М., Тетерятникова Н.Н. Мелиоидоз во Вьетнаме. Актуальные вопросы мониторинга *Burkholderia pseudomallei*. В кн.: Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия / Под ред. А.Ю. Поповой, А.В. Топоркова. Волгоград: Издательство «Волга-Пресс», 2019. С. 70–94. [Zakharova I.B., Vui T.L.A., Shpak I.M., Teteryatnikova N.N. Melioidosis in Vietnam. Topical issues of monitoring *Burkholderia pseudomallei*. In: Actual directions and prospects of Russian-Vietnamese cooperation in the sphere of ensuring sanitary and epidemiological welfare. Ed. by A.Yu. Popova, A.V. Toporkov. Volgograd: Volga-Press, 2019, pp. 70–94. (In Russ.)]
2. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. № 6. С. 103–109. [Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Melioidosis and glanders: current state and actual issues of epidemiological surveillance. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 6, pp. 103–109. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2018-6-103-109
3. Илюхин В.И., Сенина Т.В. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012. № 5. С. 41–46. [Ilyukhin V.I., Senina T.V. Melioidosis: Results of centenary study, modern problems and nearest perspectives. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2012, no. 5, pp. 41–46. (In Russ.)]
4. Ларионов Г.М., Гавенский С.Д., Погасий Н.И. Эпидемиология и профилактика мелиоидоза. В кн.: Мелиоидоз / Под ред. Н.Г. Тихонова. Волгоград: Нижневолжское книжное издательство, 1995. 224 с. [Larionov G.M., Gavenskij S.D.,

- Pogasij N.I. Epidemiology and prevention of melioidosis. In: Melioidosis. Ed. by N.G. Tikhonov. *Volgograd: Nizhnevolzhskoe Publishing House, 1995. 224 p. (In Russ.)*
5. Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. Т. 61, № 8. С. 502–507. [Lopasteiskaya Ya.A., Molchanova E.V., Sharov T.N., Kuziutina Yu.A., Zakharova I.B., Victorov D.V., Toporkov A.V. The application of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption-ionization (MALDI-ToF) for identifying agents of glanders and melioidosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2016, vol. 61, no. 8, pp. 502–507. (In Russ.)*]
 6. Прохвятилова Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Храпова Н.П., Ткаченко Г.А., Илюхин В.И., Захарова И.Б., Гришина М.А., Плеханова Н.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Булатова Т.В., Корсакова И.И., Савченко С.С., Бондарева О.С., Тетерятникова Н.Н., Сенина Т.В., Лопастейская Я.А., Батурич А.А., Куликова А.С. Сравнительная оценка информативности иммунологических и молекулярно-генетических методов и средств на этапах специфической индикации возбудителя мелиоидоза // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 12. С. 55–59. [Prokhvatilova E.V., Antonov V.A., Viktorov D.V., Khrapova N.P., Tkachenko G.A., Ilyukhin V.I., Zakharova I.B., Grishina M.A., Plekhanova N.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Bulatova T.V., Korsakova I.I., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Teteryatnikova N.N., Senina T.V., Lopasteyskaya Ya.A., Baturin A.A., Kulikova A.S. Comparative evaluation of the informativeness of immunological and molecular genetic methods and means for the stage ah of specific indication of the pathogen melioidosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2014, no. 12, pp. 55–59. (In Russ.)*]
 7. Тарасова Т.Д., Ряпис Л.А., Меринова Л.К., Сычева Н.М. Использование трансформации для картирования хромосомы *Pseudomonas pseudomallei* Трансформация бактерий на плотной среде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1983. № 7. С. 8–13. [Tarasova T.D., Riapis L.A., Merinova L.K., Sycheva N.M. Use of transformation for the chromosome mapping of *Pseudomonas pseudomallei*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 1983, no. 1, pp. 8–13. (In Russ.)*]
 8. Bartpho T., Wongsurawat T., Wongratanacheewin S., Talaat A.M., Karoonuthaisiri N., Sermiswan R.W. Genomic islands as a marker to differentiate between clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One, 2012, vol. 7, no. 6: e37762. doi: 10.1371/journal.pone.0037762*
 9. Bugrysheva J.V., Sue D., Gee J.E., Elrod M.G., Hoffmaster A.R., Randall L.B., Chirakul S., Tuanyok A., Schweizer H.P., Weigel L.M. Antibiotic resistance markers in *Burkholderia pseudomallei* strain Bp1651 identified by genome sequence analysis. *Antimicrob. Agents Chemother., 2017, vol. 61, no. 6, pp. e00010–17. doi: 10.1128/AAC.00010-17*
 10. Bulterys P.L., Bulterys M.A., Phommasone K., Luangraj M., Mayxay M., Klopogge S., Miliya T., Vongsouvath M., Newton P.N., Phetsouvanh R., French C.T., Miller J.F., Turner P., Dance D.A.B. Climatic drivers of melioidosis in Laos and Cambodia: a 16-year case series analysis. *Lancet Planet Health., 2018, vol. 2, no. 8, pp. e334–e343. doi: 10.1016/S2542-5196(18)30172-4*
 11. Chaichana P., Jenjaroen K., Amornchai P., Chumseng S., Langla S., Rongkard P., Sumonwiriya M., Jeeyapant A., Chantratita N., Teparrukkul P., Limmathurotsakul D., Day N.P.J., Wuthiekanun V., Dunachie S.J. Antibodies in melioidosis: the role of the indirect hemagglutination assay in evaluating patients and exposed populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg., 2018, vol. 99, no. 6, pp. 1378–1385. doi: 10.4269/ajtmh.17-0998*
 12. Chakravorty A., Heath C.H. Melioidosis: an updated review. *Aust. J. Gen. Pract., 2019, vol. 48, no. 5, pp. 327–332. doi: 10.31128/AJGP-04-18-4558*
 13. Challacombe J.F., Stubben C.J., Klimko C.P., Welkos S.L., Kern S.J., Bozue J.A., Worsham P.L., Cote C.K., Wolfe D.N. Interrogation of the *Burkholderia pseudomallei* genome to address differential virulence among isolates. *PLoS One, 2014, vol. 9, no. 12: e0122178. doi: 10.1371/journal.pone.0115951*
 14. Chantratita N., Rholl D.A., Sim B., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Amornchai P., Thanwisai A., Chua H.H., Ooi W.F., Holden M.T., Day N.P., Tan P., Schweizer H.P., Peacock S.J. Antimicrobial resistance to ceftazidime involving loss of penicillin-binding protein 3 in *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, vol. 108, no. 41, pp. 17165–17170. doi: 10.1073/pnas.1111020108*
 15. Chen G.B., Tuan S.H., Chen L.H., Lin W.S. Neurological melioidosis (*Burkholderia pseudomallei*) in a chronic psychotic patient treated with antipsychotics: a case report. *Medicine (Baltimore), 2018, vol. 97, no. 24: e11110. doi: 10.1097/MD.0000000000001110*
 16. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev., 2005, vol. 18, no. 2, pp. 383–416. doi: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005*
 17. Cheng A.C., O'Brien M., Freeman K., Lum G., Currie B.J. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg., 2006, vol. 74, no. 2, pp. 330–334. doi: 10.4269/ajtmh.2006.74.330*
 18. Cheng A.C., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Chierakul W., Peacock S.J. Intensity of exposure and incidence of melioidosis in Thai children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 2008, vol. 102, no. 1, pp. S37–S39. doi: 10.1016/S0035-9203(08)70010-5*
 19. Chewapreecha C., Holden M.T., Vehkala M., Välimäki N., Yang Z., Harris S.R., Mather A.E., Tuanyok A., De Smet B., Le Hello S., Bizet C., Mayo M., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Phetsouvanh R., Spratt B.G., Corander J., Keim P., Dougan G., Dance D.A., Currie B.J., Parkhill J., Peacock S.J. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat. Microbiol., 2017, vol. 2, pp. 162–163. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.263*
 20. Choy J.L., Mayo M., Janmaat A., Currie B.J. Animal melioidosis in Australia. *Acta. Trop., 2000, vol. 74, no. 2–3, pp. 153–158. doi: 10.1016/s0001-706x(99)00065-0*
 21. Cruz-Migoni A., Hautbergue G.M., Artymiuk P.J., Baker P.J., Bokori-Brown M., Chang C.T., Dickman M.J., Essex-Lopresti A., Harding S.V., Mahadi N.M., Marshall L.E., Mobbs G.W., Mohamed R., Nathan S., Ngugi S.A., Ong C., Ooi W.F., Partridge L.J., Phillips H.L., Raih M.F., Ruzhenikov S., Sarkar-Tyson M., Sedelnikova S.E., Smither S.J., Tan P., Titball R.W., Wilson S.A., Rice D.W. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. *Science, 2011, vol. 334, no. 6057, pp. 821–824. doi: 10.1126/science.1211915*

22. Cummings J.E., Slayden R.A. Transient in vivo resistance mechanisms of *Burkholderia pseudomallei* to Ceftazidime and molecular markers for monitoring treatment response. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11, no. 1: e0005209. doi: 10.1371/journal.pntd.0005209
23. Currie B.J., Kaestli M. Epidemiology: a global picture of melioidosis. *Nature*, 2016, vol. 529(7586), pp. 290–291. doi: 10.1038/529290a
24. Currie B.J., Price E.P., Mayo M., Kaestli M., Theobald V., Harrington I., Harrington G., Sarovich D.S. Use of whole-genome sequencing to link *Burkholderia pseudomallei* from air sampling to mediastinal melioidosis. *Australia. Emerg. Infect. Dis.*, 2015, vol. 21, no. 11, pp. 2052–2054. doi: 10.3201/eid2111.141802
25. Currie B.J., Ward L., Cheng A.C. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2010, vol. 4, no. 11: e900. doi: 10.1371/journal.pntd.0000900
26. Currie B.J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, vol. 36, no. 1, pp. 111–125. doi: 10.1055/s-0034-1398389
27. Dance D. Treatment and prophylaxis of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2014, vol. 43, no. 4, pp. 310–318. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.005
28. Dance D.A., Davis T.M., Wattanagoon Y., Chaowagul W., Saiphan P., Looareesuwan S., Wuthiekanun V., White N.J. Acute suppurative parotitis caused by *Pseudomonas pseudomallei* in children. *J. Infect. Dis.*, 1989, vol. 159, no. 4, pp. 654–660. doi: 10.1093/infdis/159.4.654
29. Deuble M., Aquilina C., Norton R. Neurologic melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2013, vol. 89, no. 3, pp. 535–539. doi: 10.4269/ajtmh.12-0559
30. Fu Z., Lin Y., Wu Q., Xia Q. Pediatric suppurative parotitis caused by *Burkholderia pseudomallei*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 22: 31. doi: 10.1186/s40409-016-0086-3
31. Hamad M.A., Austin C.R., Stewart A.L., Higgins M., Vázquez-Torres A., Voskuil M.I. Adaptation and antibiotic tolerance of anaerobic *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 7, pp. 3313–3323. doi: 10.1128/AAC.00953-10
32. Hoffmaster A.R., AuCoin D., Baccam P., Baggett H.C., Baird R., Bhengsi S., Blaney D.D., Brett P.J., Brooks T.J., Brown K.A., Chantratita N., Cheng A.C., Dance D.A., Decuyper S., Defenbaugh D., Gee J.E., Houghton R., Jorakate P., Lertmemongkolchai G., Limmathurotsakul D., Merlin T.L., Mukhopadhyay C., Norton R., Peacock S.J., Rolim D.B., Simpson A.J., Steinmetz I., Stoddard R.A., Stokes M.M., Sue D., Tuanyok A., Whistler T., Wuthiekanun V. Melioidosis diagnostic workshop, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, vol. 21, no. 2: e141045. doi: 10.3201/eid2102.141045
33. Hsu C.C., Singh D., Kwan G., Deuble M., Aquilina C., Korah I., Norton R. Neuromelioidosis: craniospinal MRI findings in *Burkholderia pseudomallei* infection. *J. Neuroimaging*, 2016, vol. 26, no. 1, pp. 75–82. doi: 10.1111/jon.12282
34. Kaestli M., Schmid M., Mayo M., Rothballer M., Harrington G., Richardson L., Hill A., Hill J., Tuanyok A., Keim P., Hartmann A., Currie B.J. Out of the ground: aerial and exotic habitats of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in grasses in Australia. *Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 14, no. 8, pp. 2058–2070. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02671.x
35. Le Tohic S., Montana M., Koch L., Curti C., Vanelle P. A review of melioidosis cases imported into Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2019, vol. 38, no. 8, pp. 1395–1408. doi: 10.1007/s10096-019-03548-5
36. Lim W.K., Gurdeep G.S., Norain K. Melioidosis of the head and neck. *Med. J. Malaysia*, 2001, vol. 56, no. 4, pp. 471–477.
37. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.*, 2016, vol. 1, no. 1(1): 15008. doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.8
38. Limmathurotsakul D., Peacock S.J. Melioidosis: a clinical overview. *Br. Med. Bull.*, 2011, vol. 99, pp. 125–139. doi: 10.1093/bmb/ldr007
39. Lipsitz R., Garges S., Aurigemma R., Baccam P., Blaney D.D., Cheng A.C., Currie B.J., Dance D., Gee J.E., Larsen J., Limmathurotsakul D., Morrow M.G., Norton R., O'Mara E., Peacock S.J., Pesik N., Rogers L.P., Schweizer H.P., Steinmetz I., Tan G., Tan P., Wiersinga W.J., Wuthiekanun V., Smith T.L. Workshop on treatment of and postexposure prophylaxis for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* infection, 2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 12: e2. doi: 10.3201/eid1812.120638
40. Lumbiganon P., Chotechuangnirun N., Kosalaraksa P., Teeratakulpisarn J. Localized melioidosis in children in Thailand: treatment and long-term outcome. *J. Trop. Pediatr.*, 2011, vol. 57, no. 3, pp. 185–191. doi: 10.1093/tropej/fmq078
41. McLeod C., Morris P.S., Bauert P.A., Kilburn C.J., Ward L.M., Baird R.W., Currie B.J. Clinical presentation and medical management of melioidosis in children: a 24-year prospective study in the Northern Territory of Australia and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 21–26. doi: 10.1093/cid/ciu733
42. Maharjan B., Chantratita N., Vesaratchavest M., Cheng A., Wuthiekanun V., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P., Peacock S.J. Recurrent melioidosis in patients in northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 12, pp. 6032–6034. doi: 10.1128/JCM.43.12.6032-6034.2005
43. Meumann E.M., Cheng A.C., Ward L., Currie B.J. Clinical features and epidemiology of melioidosis pneumonia: results from a 21-year study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 54, no. 3, pp. 362–369. doi: 10.1093/cid/cir808
44. Morse L.P., Smith J., Mehta J., Ward L., Cheng A.C., Currie B.J. Osteomyelitis and septic arthritis from infection with *Burkholderia pseudomallei*: A 20-year prospective melioidosis study from northern Australia. *J. Orthop.*, 2013, vol. 10, no. 2, pp. 86–91. doi: 10.1016/j.jor.2013.04.001
45. Pitman M.C., Luck T., Marshall C.S., Anstey N.M., Ward L., Currie B.J. Intravenous therapy duration and outcomes in melioidosis: a new treatment paradigm. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 3: e0003586. doi: 10.1371/journal.pntd.0003586
46. Podnecky N.L., Wuthiekanun V., Peacock S.J., Schweizer H.P. The BpeEF-OprC efflux pump is responsible for widespread trimethoprim resistance in clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 9, pp. 4381–4386. doi: 10.1128/AAC.00660-13
47. Pumpuang A., Chantratita N., Wikraiphat C., Saiprom N., Day N.P., Peacock S.J., Wuthiekanun V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2011, vol. 105, no. 10, pp. 598–600. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.06.004

48. Reckseidler-Zenteno S.L., DeVinney R., Woods D.E. The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 2, pp. 1106–1115. doi: 10.1128/IAI.73.2.1106-1115.2005
49. Sarovich D.S., Price E.P., Webb J.R., Ward L.M., Voutsinos M.Y., Tuanyok A., Mayo M., Kaestli M., Currie B.J. Variable virulence factors in *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) associated with human disease. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e91682. doi: 10.1371/journal.pone.0091682
50. Sarovich D.S., Ward L., Price E.P., Mayo M., Pitman M.C., Baird R.W., Currie B.J. Recurrent melioidosis in the Darwin Prospective Melioidosis Study: improving therapies mean that relapse cases are now rare. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 2, pp. 650–653. doi: 10.1128/JCM.02239-13
51. Sim S.H., Ong C.E.L., Gan Y.H., Wang D., Koh V.W.H., Tan Y.K., Wong M.S.Y., Chew J.S.W., Ling S.F., Tan B.Z.Y., Ye A.Z., Bay P.C.K., Wong W.K., Fernandez C.J., Xie S., Jayarajah P., Tahar T., Oh P.Y., Luz S., Chien J.M.F., Tan T.T., Chai L.Y.A., Fisher D., Liu Y., Loh J.J.P., Tan G.G.Y. Melioidosis in Singapore: clinical, veterinary, and environmental perspectives. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 2018, vol. 3, no. 1: 31. doi: 10.3390/tropicalmed3010031
52. Sim S.H., Yu Y., Lin C.H., Karuturi R.K., Wuthiekanun V., Tuanyok A., Chua H.H., Ong C., Paramalingam S.S., Tan G., Tang L., Lau G., Ooi E.E., Woods D., Feil E., Peacock S.J., Tan P. The core and accessory genomes of *Burkholderia pseudomallei*: implications for human melioidosis. *PLoS Pathog.*, 2008, vol. 4, no. 10: e1000178. doi: 10.1371/journal.ppat.1000178
53. Spring-Pearson S.M., Stone J.K., Doyle A., Allender C.J., Okinaka R.T., Mayo M., Broomall S.M., Hill J.M., Karavis M.A., Hubbard K.S., Insalaco J.M., McNew L.A., Rosenzweig C.N., Gibbons H.S., Currie B.J., Wagner D.M., Keim P., Tuanyok A. Pangenome analysis of *Burkholderia pseudomallei*: genome evolution preserves gene order despite high recombination rates. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 10: e0140274. doi: 10.1371/journal.pone.0140274
54. Stanton A.T., Fletcher W. Melioidosis, a disease of rodents communicable to man. *Lancet*, 1925, no. 205, pp. 10–13. doi: 10.1016/S0140-6736(01)04724-9
55. Tang Y., Deng J., Zhang J., Zhong X., Qiu Y., Zhang H., Xu H. Epidemiological and clinical features of melioidosis: a report of seven cases from Southern Inland China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, vol. 98, no. 5, pp. 1296–1299. doi: 10.4269/ajtmh.17-0128
56. Tuanyok A., Leadem B.R., Auerbach R.K., Beckstrom-Sternberg S.M., Beckstrom-Sternberg J.S., Mayo M., Wuthiekanun V., Brettin T.S., Nierman W.C., Peacock S.J., Currie B.J., Wagner D.M., Keim P. Genomic islands from five strains of *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Genomics*, 2008, vol. 9: 566. doi: 10.1186/1471-2164-9-566
57. Tuanyok A., Stone J.K., Mayo M., Kaestli M., Gruendike J., Georgia S., Warrington S., Mullins T., Allender C.J., Wagner D.M., Chantratita N., Peacock S.J., Currie B.J., Keim P. The genetic and molecular basis of O-antigenic diversity in *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2012, vol. 6, no. 1: e1453. doi: 10.1371/journal.pntd.0001453
58. Turner P., Klopogge S., Miliya T., Soeng S., Tan P., Sar P., Yos P., Moore C.E., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Turner C., Day N.P., Dance D.A. A retrospective analysis of melioidosis in Cambodian children, 2009–2013. *BMC Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, no. 1: 688. doi: 10.1186/s12879-016-2034-9
59. Vanaporn M., Vattanaviboon P., Thongboonkerd V., Korbsrisate S. The rpoE operon regulates heat stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, vol. 284, no. 2, pp. 191–196. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01216.x
60. Vandana K.E., Mukhopadhyay C., Tellapragada C., Kamath A., Tipre M., Bhat V., Sathiakumar N. Seroprevalence of *Burkholderia pseudomallei* among adults in coastal areas in Southwestern India. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 10, no. 4: e0004610. doi: 10.1371/journal.pntd.0004610
61. Viktorov D.V., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Kalinkina E.V., Merinova O.A., Ageeva N.P., Antonov V.A., Merinova L.K., Alekseev V.V. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008, vol. 102, no. 1, pp. S103–S110. doi: 10.1016/S0035-9203(08)70025-7
62. Wang Y.S., Wong C.H., Kurup A. Cutaneous melioidosis and necrotizing fasciitis caused by *Burkholderia pseudomallei*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, vol. 9, no. 11, pp. 1484–1485. doi: 10.3201/eid0911.030370
63. Webb J.R., Sarovich D.S., Price E.P., Ward L.M., Mayo M., Currie B.J. *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide genotype does not correlate with severity or outcome in melioidosis: host risk factors remain the critical determinant. *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, vol. 6, no. 4: ofz091. doi: 10.1093/ofid/ofz091
64. White M.E., Hunt J., Connell C., Langdon K. Paediatric neurological melioidosis: a rehabilitation case report. *Rural Remote Health*, 2016, vol. 16, no. 1: 3702. doi: 10.1016/s0140-6736(03)13374-0
65. White N.J. Melioidosis. *Lancet*, 2003, vol. 361, no. 9370, pp. 1715–1722. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13374-0
66. Whitmore A., Krishnaswami C.S. A hitherto undescribed infective disease in Rangoon. *Ind. Med. Gaz.*, 1912, vol. 47, no. 7, pp. 262–267.
67. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 2018, vol. 1, no. 4: 17107. doi: 10.1038/nrdp.2017.107
68. Wongwandee M., Linasmita P. Central nervous system melioidosis: a systematic review of individual participant data of case reports and case series. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2019, vol. 13, no. 4: e0007320. doi: 10.1371/journal.pntd.0007320
69. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, 1992, vol. 36, no. 12, pp. 1251–1275. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x
70. Yabuuchi E., Wang L., Arakawa M., Yano I. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* strains at 5 degrees C. *Kansenshogaku Zasshi*, 1993, vol. 67, no. 4, pp. 331–335. doi: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.67.331
71. Yazid M.B., Fauzi M.H., Hasan H., Md Noh A.Y., Deris Z.Z. An 11-year analysis of emergency presentations of melioidosis in northeastern Malaysia. *J. Immigr. Minor Health*, 2017, vol. 19, no. 3, pp. 774–777. doi: 10.1007/s10903-016-0429-8
72. Yi H., Cho K.H., Cho Y.S., Kim K., Nierman W.C., Kim H.S. Twelve positions in a β -lactamase that can expand its substrate spectrum with a single amino acid substitution. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 5: e37585. doi: 10.1371/journal.pone.0037585

73. Zakharova I.B., Lopasteyskaya Y.A., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Influence of biochemical features of *Burkholderia pseudomallei* strains on identification reliability by Vitek 2 System. *J. Glob. Infect. Dis.*, 2018, vol. 10, no. 1, pp. 7–10. doi: 10.4103/jgid.jgid_39_17
74. Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex. *Acta Trop.*, 2017, vol. 174, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.06.016

Авторы:

Захарова И.Б., к.б.н., доцент, зав. отделом микробиологического мониторинга особо опасных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Топорков А.В., д.м.н., доцент, директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Викторов Д.В., д.б.н., доцент, зам. директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Zakharova I.B., PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Toporkov A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Director of Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Viktorov D.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director of Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.08.2020
Принята к печати 27.03.2021

Received 13.08.2020
Accepted 27.03.2021

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПРИМЕРЕ ХЛАМИДИОЗА

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

НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия

Резюме. В настоящем обзоре предоставлены анализ научной информации и систематизированные сведения, касающиеся микробиологии и патогенеза хламидийной инфекции. Хламидии являются облигатными внутриклеточными микроорганизмами, чувствительными к любым клеткам организма человека, где возможно энергетическое паразитирование: к различным типам эпителия, включая плоский эпителий оболочек мозга и глазного яблока, фиброцитам, гистиоцитам, глиальным и мышечным клеткам, нейронам, моноцитам, макрофагам. Хламидии по своей структуре, химическому составу и энзиматической активности близки к грамотрицательным бактериям, имеют клеточную стенку, рибосомы, ДНК, РНК, биохимические элементы гликолиза, тканевого дыхания, синтеза пептозы, чувствительны к ряду антибиотиков широкого спектра, обладают возможностью деления вегетативных форм. В последние десятилетия активно изучается патогенез и клиническая симптоматика хламидийных поражений урогенитального тракта, нервной, кардиоваскулярной, опорно-двигательной и бронхо-легочной систем, продолжают разрабатываться новые подходы и схемы лечения больных, инфицированных хламидиями. Хламидийная инфекция на протяжении многих десятков лет является важной и актуальной проблемой не только из-за высокой распространенности, но и ввиду большой частоты осложнений, негативно влияющих на здоровье населения и его демографические показатели. Хламидии вызывают множество заболеваний, приводящих к хронизации воспалительного процесса всех органов и систем организма человека. Обязательный статистический учет случаев выявления хламидиоза, введенный в Российской Федерации еще в 1994 г., не отражает реальной заболеваемости. Рост числа воспалительных заболеваний верхних отделов респираторного тракта, обусловленных хламидиями, несомненно повышает этиологическую значимость этого возбудителя, однако сведения, касающиеся этиопатогенетической роли хламидий при патологии ЛОР-органов, носят неоднозначный и противоречивый характер. При этом в литературных источниках представлен широкий диапазон частоты выявления хламидийного возбудителя. Это связано с недостаточной информированностью врачей о микробиологических свойствах хламидий, патогенетических и клинических особенностях проявления этой инфекции, а также отсутствием общего и четкого мнения в отношении алгоритмов идентификации и лечения хламидиоза. Поскольку большинство нозологических форм, ассоциированных с этим возбудителем, имеют бессимптомное течение, знание патогенетических особенностей внутриклеточной инфекции на примере хламидиоза позволит предупредить распространение инфекции и снизить социально-экономические последствия, обусловленные хламидиозом.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, респираторный хламидиоз, противохламидийный иммунитет, персистенция хламидий, патогенез, иммунитет.

Адрес для переписки:

Маркина Анжела Николаевна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г,
НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН.
Тел.: 8 (391) 212-52-88. Факс: 8 (391) 228-06-83.
E-mail: Angel.lor.ru@mail.ru

Contacts:

Angela N. Markina
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak str., 3G, Research Institute of Medical Problems
of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk.
Phone: +7 (391) 212-52-88. Fax: +7 (391) 228-06-83.
E-mail: Angel.lor.ru@mail.ru

Для цитирования:

Маркина А.Н., Капустина Т.А., Парилова О.В., Белова Е.В.
Патогенетические особенности внутриклеточной инфекции на примере
хламидиоза // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 423–432.
doi: 10.15789/2220-7619-PCO-1213

Citation:

Markina A.N., Kapustina T.A., Parilova O.V., Belova E.V. Pathogenic
characteristics of intracellular infection in chlamydiosis // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3,
pp. 423–432. doi: 10.15789/2220-7619-PCO-1213

PATHOGENIC CHARACTERISTICS OF INTRACELLULAR INFECTION IN CHLAMYDIOSIS

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

Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. This review analyzes scientific data and systematized information regarding microbiological aspects and pathogenesis of chlamydia infection. Chlamydia are obligate intracellular microorganisms that are sensitive to any human cells where energy parasitism is possible: various types of epithelium, fibrocytes, histiocytes, glial and muscle cells, squamous epithelium of the meninges and eyeball, neurons, monocytes, macrophages. Structure, chemical composition and enzymatic activity of Chlamydia closely resemble those in Gram-negative bacteria, as they retain their morphological identity throughout the life cycle, possess cell wall, ribosomes, DNA, RNA, biochemical elements of glycolysis, tissue respiration, peptose production being sensitive to some broad-spectrum antibiotics, and are able to vegetative form division. In recent decades, the pathogenesis and clinical symptoms of chlamydial lesions in the urogenital tract, nervous, cardiovascular, musculoskeletal and bronchopulmonary systems have been actively studied, and new approaches and treatment schemes for chlamydia-infected patients are still developing. Over many decades, Chlamydia infection has been an important and urgent problem, not only due to its high prevalence, but also because of high rate of complications negatively affecting populational health and related demographic parameters. Chlamydia causes multiple diseases resulting in chronization of inflammatory process in all human organs and systems, and affects reproduction of population. Mandatory statistical recording of chlamydiosis cases introduced as early as in 1994 in the Russian Federation does not reflect the actual incidence rate. A rise in number of inflammatory diseases of the upper respiratory tract caused by Chlamydia undoubtedly increases its etiological importance, but data regarding etiopathogenetic role of Chlamydia in ENT pathology are ambiguous and contradictory. Available publications describe a large range of variation in rate of detected Chlamydia due to poor awareness of doctors about the microbiological properties of chlamydia, pathogenetic and clinical features of clinical signs of this infection, and lack of common and clear understanding on the algorithms for identifying and treating chlamydiosis. Since the majority of chlamydia-associated nosological forms are asymptomatic, knowing pathogenetic features of related will allow to prevent the spread of the infection and reduce subsequent socio-economic consequences.

Key words: *Chlamydia infection, respiratory Chlamydiosis, anti-Chlamydia immunity, Chlamydia persistence, pathogenesis, immunity.*

Хламидийная инфекция в последние годы приобрела особое медицинское и социальное значение. Существенное распространение хламидиозов в человеческой популяции привело к росту воспалительных заболеваний и, как следствие, к повышению этиологической значимости внутриклеточных инфекций. Хламидии вызывают множество заболеваний с хроническим течением воспалительных процессов всех органов и систем организма человека и оказывают влияние на его репродуктивную функцию. В 1994 г. в Российской Федерации был введен обязательный статистический учет случаев выявления хламидиоза, который не отразил реальной заболеваемости. Это связано с недостаточной информированностью врачей о микробиологических свойствах хламидий, патогенетических и клинических особенностях проявления этого возбудителя, отсутствием общего и четкого мнения в отношении алгоритмов идентификации и лечения хламидиоза, противоречивостью и ограниченным объемом научных данных. Поэтому целью настоящего обзора стал анализ научной информации и систематизация сведений, отражающих аспекты микробиологии и патогенеза хламидийной инфекции.

В последние десятилетия активно изучается патогенез и клиническая симптоматика хламидийных поражений уrogenитального

тракта, нервной, сердечнососудистой, опорно-двигательной и бронхо-легочной систем, продолжают разрабатываться средства и способы терапии больных с хламидийной инфекцией. Хламидиоз диагностируется у 10–40% больных с патологией мочеполовой и пищеварительной систем [3, 13, 14, 30, 33, 35, 38, 39], у 25% больных острой респираторной инфекцией, у 5–10% больных бронхитом и пневмонией [13, 27, 28, 45].

Ученые все чаще стали изучать хламидийную инфекцию при патологии верхних дыхательных путей и среднего уха [40, 42, 46], но при этом среди врачей-оториноларингологов нет единого мнения об этиопатогенетической значимости хламидийного возбудителя в развитии ЛОР-заболеваний, потому в литературных источниках представлен широкий диапазон частоты выявления хламидийного возбудителя — от 3 до 53% [12, 18].

Впервые внутриклеточные включения хламидий были обнаружены в 1907 г. в клетках плоского эпителия при трахоме. Анализ отдельных фенотипических, культуральных и морфологических признаков привел к открытию в 1957 г. *Chlamydia trachomatis*, затем в 1963 г. — *Chlamydia psittaci*, в 1989 г. — *Chlamydia pneumoniae*, в 1993 г. — *Chlamydia pecorum*.

С 1999 г. в порядке *Chlamydiales* выделялись 4 семейства: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*,

Simkaniaceae, *Waddiaceae*. Семейство *Chlamydiaeae* состояло из двух родов: *Chlamydia* и *Chlamydophila*. В первый род входили 3 вида: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia suis*, во второй — *Chlamydophila pneumoniae* и *Chlamydophila psittaci* (ранее носили названия *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia psittaci*), *Chlamydia abortus*, *Chlamydia caviae*, *Chlamydia felis*.

Патогенными для человека видами являются *C. pneumoniae*, *C. psittaci* и *C. trachomatis*. *C. abortus* может вызывать самопроизвольные выкидыши у женщин, контактирующих с мелким рогатым скотом. Одним из этиологических факторов развития ринитов и конъюнктивитов у кошек и у их хозяев является *C. felis* [11, 19]. Хламидии — внутриклеточные облигатные энергетические паразиты, тропные к различным типам эпителия, в том числе к плоскому эпителию оболочек мозга и глазного яблока, фиброцитам, гистиоцитам, глиальным и мышечным клеткам, нейронам, моноцитам, макрофагам и т. д. [19]. По структуре, химическому составу и энзиматической активности близки к грамотрицательным бактериям, имеют клеточную стенку, рибосомы, ДНК, РНК, биохимические элементы гликолиза, тканевого дыхания, синтеза пептозы, чувствительны к ряду антибиотиков широкого спектра, обладают возможностью деления вегетативных форм. Хламидии похожи на вирусы, полностью зависят от хозяина, не культивируются на питательных средах и проходят через бактериальные фильтры, задерживающие другие бактерии. Поэтому долгое время хламидии определялись как «крупные вирусы». Хламидии обладают всеми атрибутами патогенности, так как вызывают первичную инфекцию, способны к внутриклеточному существованию, продуцируют белковые экзотоксины, в том числе и белок теплового шока, способны к персистенции, инвазии, диссеминации, индукции и задержке апоптоза инфицированной клетки.

В организме человека хламидии присутствуют в виде двух форм возбудителя — элементарных и ретикулярных телец, отличающихся по морфологическим и биологическим свойствам. Уникальность хламидийного возбудителя заключается в особенности циклов внутриклеточного развития, нехарактерных для других бактерий. Элементарные тельца (ЭТ) — это высокоинфекционная форма возбудителя, они приспособлены к внеклеточному существованию, чувствительны к антибиотикам. Ретикулярные тельца (РТ) — репродуктивная форма существования возбудителя: более крупные, метаболически активные внутриклеточные образования, чувствительны к антибиотикам, интерферону. Наличие трансформирующих факторов способствует переходу хламидий

в L-формы, основной характеристикой которых является частичное или полное отсутствие клеточной стенки, что приводит к длительной персистенции возбудителя в организме человека.

Как и при любой инфекции, в ответ на проникновение хламидий развиваются неспецифические и специфические защитные реакции макроорганизма. При хламидийной инфекции эти процессы имеют некоторые особые черты, обусловленные двухфазным жизненным циклом, внутриклеточным способом паразитирования и метаболизмом возбудителя. Из-за антилизосомальных ферментов, вырабатываемых хламидиями, уничтожение внутриклеточных возбудителей лизосомальными ферментами эпителиальных клеток-мишеней не происходит. При взаимодействии хламидий с фагоцитами, в том числе и макрофагами, фагоцитоз также не всегда завершается лизисом, что способствует циркуляции возбудителя по лимфо- и кровотоку и приводит к генерализации инфекционного процесса с возникновением экстареспираторных очагов инфекции. Хламидийная инфекция оказывает супрессивное действие на систему комплемента [32], которое проявляется в снижении концентрации компонентов комплемента C3a и C5a. Это приводит к угнетению хемотаксиса полиморфноядерных лейкоцитов в очаге воспаления и высвобождению медиаторов из тучных и других клеток [15, 25].

Учитывая существование хламидий в виде внутри- и внеклеточных форм, следует различать две мишени для иммунных реакций макроорганизма: ЭТ, высвобождающиеся из зараженных клеток при репликативной инфекции, и инфицированные клетки с находящимися в них РТ, экспрессирующие на своей поверхности антигены возбудителя. Каскад иммунных реакций при хламидийной инфекции обусловлен антигенными детерминантами — липополисахаридами (ЛПС), белками клеточной стенки (МOMP, OMP-2, OMP-3). Белки клеточной стенки и ЛПС обладают не только антигенными свойствами, но и представляют собой выраженные токсины. OMP-2 проявляет свойства как эндотоксина, так и экзотоксина, который частично секретируется микробной клеткой во внешнюю среду. Кроме этого, OMP-2 обладает суперантигенным действием, что способствует неспецифической активации Т-лимфоцитов с последующим образованием большого количества интерлейкина-2 (IL-2) и фактора некроза опухоли- α (TNF α). ЛПС, будучи универсальным фактором патогенности хламидий, выступает в роли эндотоксина, мишенью для действия которого являются клетки многих органов человека, в том числе и клетки крови (гранулоциты, моноциты). ЛПС хлами-

дий, в отличие от белков клеточной стенки, является слабым антигеном, причем в малых количествах он стимулирует иммунную систему, тогда как в больших количествах, наоборот, угнетает ее. Являясь суперантигеном, ЛПС вызывает неспецифическую стимуляцию Т- и В-лимфоцитов и, как следствие этого, синтез большого количества цитокинов, в том числе IL-2 и TNF α , а также поликлональную продукцию иммуноглобулинов [6].

Синтез антител всех классов к хламидийным антигенам начинается на стадии элементарных телец, при выходе из клетки хозяина. ЭТ и их отдельные антигенные компоненты атакуются сывороточными хламидийными антителами в содружестве с фагоцитами и комплементом, за исключением секреторных IgA и IgM, которые выполняют свои нейтрализующие функции самостоятельно. Через пять дней после первичной колонизации хламидий и выхода первых ЭТ появляются антитела класса IgM, которые нарабатываются сначала к ЛПС, а затем и к МOMP. Основное количество IgM находится в сосудистом русле, в секретах слизистых оболочек IgM встречается главным образом в виде секреторного иммуноглобулина М, который обладает нейтрализующей активностью и является мощным активатором комплемента. Присутствие антител IgM указывает на активность процесса или наличие заражения, но также титр IgM может повышаться при реактивации, реинфицировании или суперинфицировании. Период полураспада антител IgM составляет 5 дней, они не проникают через плаценту, могут синтезироваться у плода и относятся к собственным антителам новорожденных.

Через 10–14 дней после инфицирования к основному белку МOMP и ОМР-2 в сыворотке крови синтезируются антитела класса IgA, индикатором успешного лечения является снижение титра к 2–4-му месяцу. Период полураспада IgA составляет 5–8 дней. Секреторный IgA является мощным нейтрализатором, ингибирует адгезию вирусов и бактерий, кроме этого, он усиливает фагоцитарную активность макрофагов и полиморфно-ядерных клеток крови и в меньшей степени, чем IgM, активизирует компоненты комплемента. Повышенные титры IgA наблюдаются при первичном хламидиозе и при реинфекции, в меньшей степени титры увеличиваются при обострении хронического процесса. Противохламидийный IgG обнаруживается в сыворотке крови к концу третьей недели после появления первых ЭТ. Выработка IgG осуществляется на хламидийные ЛПС и МOMP, период полураспада составляет 23 дня. IgG также можно выявить и в секрете слизистых оболочек в случаях повышенной проницае-

мости эпителиального пласта в условиях воспаления, но без секреторного компонента. IgG усиливает фагоцитоз и комплемент-зависимый лизис, обладает выраженным нейтрализующим действием. Диагностически значимые титры IgG выявляются при хроническом хламидиозе, и значительное их повышение имеет место при обострении процесса.

Из-за слабой антигенной нагрузки при местном вялотекущем процессе наработка сывороточных антител в диагностических титрах происходит лишь у 60–70% лиц с заболеваниями урогенитальной системы [19]. При воспалительной патологии носа, придаточных пазух носа и глотки диагностически значимые титры противохламидийных иммуноглобулинов выявляются еще реже. Так, согласно нашим исследованиям, только у 33% (95%, ДИ 18–41%) больных с верифицированной хламидийной инфекцией были выявлены сывороточные хламидийные антитела изотипа G к *S. pneumoniae* и *S. trachomatis*. Сывороточные противохламидийные иммуноглобулины изотипа A и M были обнаружены в единичных случаях [7, 44]. Для элиминации инфицированных хламидиями клеток, содержащих РТ, задействуется клеточное звено иммунитета с вовлечением Т-лимфоцитов-хелперов первого типа (Th1). Последние с помощью активированных макрофагов формируют гранулему с последующим перевариванием хламидийных антигенов. Ключевая роль в противохламидийном иммунном ответе принадлежит цитокинам, являющимся продуктами Th1 и активированных макрофагов. Однако внутриклеточное существование хламидий значительно ограничивает доступность их антигенных субстанций и, соответственно, снижает иммуногенность возбудителя, а следовательно, и санирующий эффект цитокинов.

Вследствие запуска иммунного ответа в виде активации Т-лимфоцитов начинается продукция цитокинового профиля, в частности противовоспалительного цитокина IFN γ (интерферон гамма), который активизирует макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, повышает резистентность клеток к внутриклеточным микроорганизмам, стимулирует синтез IL-1, IL-2 и иммуноглобулинов [44]. Высокие уровни IFN γ полностью ингибируют рост хламидий, низкие уровни индуцируют развитие морфологически аномальных внутриклеточных форм [16].

К сожалению, стойкий специфический иммунитет к хламидийной инфекции не вырабатывается [4, 9, 17, 23]. Недостаточность иммунного ответа объясняется феноменом незавершенности фагоцитоза, проявляющегося снижением бактерицидной активности нейтрофилов (по тесту восстановления нитроси-

него тетразолия), на фоне повышения их количества, напряженностью в фагоцитарном звене и неадекватной реакцией иммунной системы на эту инфекцию [9].

При хроническом хламидиозе любых органов и систем возникают более или менее выраженные вторичные иммунодефицитные состояния комбинированного типа: снижение клеточного иммунитета, фагоцитарной активности, повышение концентрации циркулирующих иммунных комплексов, нарушение интерферонового статуса и активности комплемента. Наши данные также подтверждают этот факт [25]. При анализе иммунограмм больных с хламидийной инфекцией верхних дыхательных путей по сравнению с референтными показателями было выявлено угнетение Т-клеточного звена иммунитета с активацией В-лимфоцитов почти у половины обследованных лиц. Кроме этого, у трети больных обнаружены изменения в лейкограммах: относительный и абсолютный эозинофильный лейкоцитоз. Все вышеперечисленное свидетельствует о системном влиянии хламидийного инфицирования респираторного тракта, приводящего к дисбалансу гомеостатических механизмов в организме человека.

Основопологающим механизмом в патогенезе хламидийного инфицирования является способность к персистенции, то есть нахождения возбудителя в организме человека в трансформированной форме — L-форме. Метаболическая активность хламидий в условиях персистенции значительно уменьшается, происходит задержка роста, замедление перехода РТ в ЭТ [7, 34]. Предрасполагающими факторами для запуска персистенции хламидий являются неадекватная этиотропная терапия, недостаточность клеточного и гуморального иммунного ответа макроорганизма [21].

При персистенции хламидий определяется существенное снижение или полное прекращение продукции МОМР, который является основным иммуногеном хламидий, придающим высокую степень специфичности антительного и клеточного иммунных ответов макроорганизма. Также снижается синтез ЛПС клеточной стенки хламидий, но в меньшей степени, чем МОМР. Однако наряду с этим персистирующие хламидии продолжают синтезировать и активно высвобождать белок теплового шока (OMP-2), который является доминантным белком у большинства патогенных микроорганизмов. Именно антигенам этого белка принадлежит основная роль в патогенезе персистирующей хламидийной инфекции. У человека белки теплового шока представляют собой семейство разнообразных внутриклеточных протеинов, участвующих в сборке и транспорте белков, ре-

гуляции АТФ-активности. Эти белки относятся к белкам стрессового клеточного ответа.

Так как хламидийному ОМР-2 свойственна высокая степень (50%) гомологии с аминокислотным составом человеческих белков теплового шока, в инфицированном хламидиями макроорганизме существует высокая вероятность развития аутоиммунных процессов [16, 20]. Хламидийный ОМР-2 является выраженным иммуногеном, который приводит к усилению продукции иммунокомпетентными клетками и макрофагами различных цитокинов (IL-1, IL-2, TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ), подавляющих активное размножение РТ, но не уничтожающих эти формы хламидий, что в итоге способствует формированию персистенции.

Таким образом, в персистирующем состоянии хламидийная инфекция менее иммуногенна, а иммунный ответ менее специфичен, чем при продуктивном варианте течения, так как ответная реакция макроорганизма формируется только на ОМР-2 и ЛПС. Обнаружение высоких титров антител к хламидийному ОМР-2 является маркером персистирующей хламидийной инфекции. В основе развития персистенции хламидий лежит сочетанное действие комплекса цитокинов, блокирующих синтез МОМР и обуславливающих дефицит ряда метаболитов, необходимых для дифференциации РТ в ЭТ. При минимальном микробицидном влиянии на хламидии биологически активные цитокины ведут к повреждению собственных клеток организма с последующим развитием рубцово-склеротических изменений слизистой оболочки.

Цитокины IL-2, TNF β , TNF α и IFN γ являются продуцентами Т-лимфоцитов (Th0, Th1). Стимулированные IFN γ макрофаги синтезируют IL-1, TNF α , IFN α , IFN β и другие биологически активные вещества. TNF β и IL-1 способствуют пролиферации фибробластов, приводящей к фиброзным изменениям в слизистой оболочке и подслизистом слое. TNF α способствует блокированию репродукции внутриклеточных РТ путем усиления экспрессии мембранных белков клетки. Активизированные макрофаги продуцируют активные формы кислорода и свободные радикалы, которые, однако, не способны нанести хламидии существенного вреда, так как клеточную стенку прочность ее клеточной стенки обеспечивается антиоксидантными дисульфидными связями между структурными белками. Помимо этого, она усилена полисахаридной микрокапсулой, устойчивой к супероксидному радикальному окислению [1, 8, 31]. Поэтому хламидии устойчивы к продуктам «респираторного взрыва», а повреждаются при этом эпителиоциты и другие клетки-мишени хозяина, что ведет к рубцеванию и склероти-

ческим изменениям слизистой оболочки. Если высокая концентрация IFN γ ингибирует репродукцию хламидий, активизирует лизис возбудителя в макрофагах и других фагоцитирующих клетках, то низкая концентрация способствует развитию L-подобной трансформации РТ с последующим переходом в персистенцию [2, 10]. Это связано с тем, что IFN γ усиливает экспрессию антигенов клеточных мембран (белков МНС I, МНС II, Fc-рецепторов, ICAM-1 и др.). Вследствие этого возрастает адгезивная способность мембран эпителиоцитов и фибробластов, что значительно облегчает проникновение хламидий внутрь клетки [21]. Кроме этого, низкие дозы IFN γ вызывают снижение концентрации внутриклеточного триптофана — метаболита, необходимого для построения МOMP, что также способствует развитию персистенции [9]. Немаловажная роль в формировании нетипичных форм хламидий принадлежит дефициту таких метаболитов, как антагонисты Ca⁺ и цистеин.

Таким образом, воздействие трансформирующих факторов приводит к образованию атипичных форм хламидий. В результате сочетанного действия различных цитокинов Т-лимфоцитов и макрофагов, синтез которых индуцируется хламидийным ОМР-2, возникает «порочный круг», ведущий к вялотекущему гранулематозному воспалению с пролиферативно-склерозирующим компонентом и сохранением в очаге L-форм хламидий с минимальным уровнем метаболизма. Персистенция хламидий приводит к удлинению течения воспалительного процесса со склонностью к возникновению рубцовых изменений в тканях [29]. Состояние персистенции — это нестойкий процесс, и при исчезновении неблагоприятных факторов персистирующая форма может легко перейти к цитотоксическому существованию и манифестации инфекции [4, 43].

В зависимости от видовых свойств для представителей семейства *Chlamydiaceae* характерны различные пути инфицирования. Для хламидофильной инфекции более характерен аэрозольный путь заражения, но, учитывая тропность данного микроорганизма к клеткам крови, возможны гематогенный и лимфогенный пути. Механизм передачи инфекции, вызываемой *C. trachomatis*, контактный, для него наиболее характерны половой, контактно-бытовой, водный, внутриутробный, интра- и неонатальный пути [2, 11, 23, 26]. Есть данные о заносе этого возбудителя на слизистую верхних дыхательных путей через слезно-носовой канал при хламидийном инфицировании глаз [36].

Поражение респираторного тракта хламидиозом возможно также вследствие ороргинальных половых контактов: так, по данным аме-

риканских ученых С. Эдвардса и К. Карнэ [36], *C. trachomatis* выделяли из глотки у 1,3% мужчин-гомосексуалистов, а среди гетеросексуалистов — у 3,7% мужчин и 3,2% женщин, практиковавших фелляцию и куннилингус [5].

Восприимчивость к хламидийной инфекции достигает 100%, особенно она высока у лиц с иммунодефицитными состояниями [2, 43]. В зависимости от массивности инфицирования, наличия сопутствующей патологии и состояния иммунной системы при поражении хламидиями эпителиальных клеток слизистой оболочки носа и глотки могут реализовываться различные пути взаимодействия возбудителя с макроорганизмом: самопроизвольное выздоровление, репродуктивный (цитотоксический) и непродуктивный варианты развития инфекции.

Самопроизвольное выздоровление обусловлено деструкцией хламидий в фаголизосомах в условиях полноценной реализации антимикробного потенциала зараженных эпителиальных клеток и факторов резистентности макроорганизма. Закономерности и особенности патогенеза, а также частота самостоятельных выздоровлений при хламидийной инфекции ЛОР-органов пока до конца не изучены.

В литературе достаточно подробно описан патогенез цитотоксического варианта развития урогенитального хламидиоза [17, 19, 22]. Печатных работ, посвященных патогенетическим особенностям хламидийной инфекции верхних дыхательных путей, мы не обнаружили. Однако учитывая общность биологических особенностей *C. pneumoniae* и *C. trachomatis* и клинико-морфологических проявлений этой инфекции, патогенез хламидийного поражения верхних дыхательных путей можно представить в следующем виде.

Для возникновения заболевания инфекционные частицы хламидий (РТ) должны попасть в эпителиальную клетку и размножиться в фагосоме, т. е. должна произойти колонизация возбудителя. В процессе фиксации (адгезии) ЭТ к плазматической мембране эпителиоцита принимают участие, с одной стороны, ЛПС и белки клеточной стенки микроорганизма, с другой — мембранные рецепторные белки клетки-мишени, комплементарные к белкам хламидий. Важную роль в адгезии играют электростатические и гидрофобно-гидрофильные взаимодействия. Оболочка фагосомы, образуемая из выпячивания плазматической мембраны эпителиоцита, не повреждается лизосомальными ферментами клетки-хозяина вследствие действия антилизосомальных ферментов хламидий и наличия у возбудителя защитных поверхностных структур [10, 19, 22].

Хламидии в процессе своего репликативного цикла развития используют энергетические

соединения, нуклеотиды, аминокислоты, кофакторы клетки-хозяина и нарушают проницаемость плазматической мембраны, в результате чего расстраивается обмен веществ в клетке-мишени, что приводит к ее гибели. Немаловажную роль в деструктивном «эффekte» хламидий играет растяжение и разрыв стенок фагосом и плазматической мембраны многочисленным потомством РТ, которые при активном размножении могут занимать большую часть клетки [21]. В результате выхода в окружающие ткани гидролитических ферментов и токсических продуктов аутолиза разрушенных эпителиоцитов, токсических субстанций самих хламидий происходит повреждение окружающих тканей, нарушается целостность эпителиального слоя. На месте первичного очага вследствие активизации неспецифических и специфических гуморально-клеточных факторов защиты возникают отек, гиперемия, лейкоцитарная и лимфоцитарная субэпителиальная инфильтрация, направленные на элиминацию флорогенных начал и репарацию поврежденных тканей. Воспалительный процесс продолжается до полного удаления всех повреждающих факторов, в том числе и самого возбудителя и его фрагментов, или пока не сформируется гранулематозный фиброзно-тканевой барьер, ограничивающий очаг поражения, или не произойдет переход хламидий из активной формы в пассивную (L-форму).

Перечисленные исходы воспалительной реакции на хламидийный возбудитель определяют варианты течения респираторного хламидиоза: острый процесс с самовыздоровлением или выздоровлением после применения этиотропной, патогенетической и симптоматической терапии, хронизация и персистенция. Хронизации инфекции способствуют ишемия в очаге поражения вследствие действия арахидонатов (тромбоксанов, лейкотриенов и простагландинов), а также паралич ресничек мерцательного эпителия, вызываемый хламидиями [26]. Важную роль в патогенезе хламидиоза играет местная генерализация инфекции *per continuitatem*, т. е. последовательное поражение эпителиального слоя.

В половине случаев респираторного хламидиоза наблюдаются микробные ассоциации хламидий с другими патогенными и оппортунистическими микроорганизмами, т. е. имеет место смешанная инфекция и полиэтиологичность воспалительной патологии. Спектр этиологических агентов воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, сопряженных с хламидийной инфекцией, достаточно обширен, причем не всегда можно достоверно определить видовой состав его структуры. Наличие смешанной инфекции способствует оптимальной адаптации всех этиологических агентов, составляющих микробную ассоциацию, и усиливает патогенные свойства каждого из них, способствуя лучшей сопротивляемостью к антимикробным факторам [10, 41]. Кроме этого, наши исследования показали, что в качестве возбудителей в 6–10% респираторных хламидийных поражений могут одновременно выступать и *S. pneumoniae* и *S. trachomatis* [24, 25].

Заключение

Таким образом, воспалительный процесс хламидийной этиологии, локализующийся в слизистой оболочке верхнего отдела респираторного тракта, протекает чаще всего бессимптомно, со склонностью к хронизации и генерализации и требует проведения своевременной диагностики внутриклеточной бактериальной инфекции и адекватного этиотропного комплекса лечебных мероприятий и диспансерного наблюдения. Представленная в статье информация о микробиологии и патогенетических особенностях хламидийной инфекции будет полезна не только для оториноларингологов, но и для врачей других специальностей, занимающихся как научной, так и практической деятельностью.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и об отсутствии финансирования.

Список литературы/References

1. Актуальные вопросы диагностики и лечения хламидийных инфекций: материалы всесоюз. совещ. / Под ред. А.А. Шаткина и др. М.: 1990. 136 с. [Topical issues of diagnosis and treatment of chlamydial infections: the All-Union Counsel materials. Ed. by A.A. Shatkin et al. Moscow: 1990. 136 p. (In Russ.)]
2. Алешукина А.В. Медицинская микробиология. Ростов н/Д: Феникс, 2003. 471 с. [Aleshchukina A.V. Medical microbiology. Rostov on Don: Phoenix, 2003. 471 p. (In Russ.)]
3. Анкирская А.С. Проблемы хронической (персистирующей) хламидийной инфекции // Акушерство и гинекология. 1999. № 3. С. 8–10. [Ankirkaya A.S. Problems of chronic (persistent) chlamydial infection. Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and gynecology, 1999, no. 3, pp. 8–10. (In Russ.)]
4. Битти В.Л., Моррисон Р.П., Бирн Д.И. Персистенция хламидий: от клеточных культур до патогенеза хламидийной инфекции // Заболевания, передающиеся половым путем. 1996. № 6. С. 3–18. [Beatty V.L., Morrison R.P., Byrne D.I. Chlamydia persistence: from cell cultures to the pathogenesis of chlamydial infection. Zabolevaniia, peredayushhiesia polovym putem = Sexually Transmitted Diseases, 1996, no. 6, pp. 3–18. (In Russ.)]

5. Болтович А.В., Чернецова Л.Ф., Ермаков Н.В., Липская О.В. Урогенитальный хламидиоз у женщин: методическое пособие. Тюмень: Вектор-Бук, 1999. 44 с. [Baltovich A.V., Chernetsova L.F., Ermakov N.V., Lipskaya O.V. Urogenital chlamydia in women: a methodological guide. *Tyumen: Vektor-Buk, 1999. 44 p. (In Russ.)*]
6. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: МИА, 2002. 734 с. [Borisov L.B. Medical microbiology, virology and immunology. *Moscow: MIA, 2002. 734 p. (In Russ.)*]
7. Брагина Е.Е., Орлова О.Е., Дмитриев Г.А. Некоторые особенности жизненного цикла хламидий. Атипичные формы существования: обзор литературы // Заболевания, передающиеся половым путем. 1998. № 1. С. 3–9. [Bragina E.E., Orlova O.E., Dmitriev G.A. Some features of the life cycle of chlamydia. Atypical forms of existence: literature review. *Zabolevaniia, peredayushhiesia polovym putem = Sexually Transmitted Diseases, 1998, no. 1, pp. 3–9. (In Russ.)*]
8. Глазкова Л.К., Герасимова Н.М. Клинико-иммунологические критерии развития нарушений репродуктивной функции у женщин с генитальной хламидийной инфекцией // Заболевания, передающиеся половым путем. 1997. № 2. С. 18–20. [Glazkova L.K., Gerasimova N.M. Clinical and immunological criteria for the development of reproductive disorders in women with genital chlamydia infection. *Zabolevaniia, peredayushhiesia polovym putem = Sexually Transmitted Diseases, 1997, no. 2, pp. 18–20. (In Russ.)*]
9. Глазкова Л.К., Герасимова Н.М. Урогенитальная хламидийная инфекция. Екатеринбург: Уральский рабочий, 1997. 74 с. [Glazkova L.K., Gerasimova N.M. Urogenital chlamydial infection. *Yekaterinburg: Ural'skii Rabochii, 1997. 74 p. (In Russ.)*]
10. Гранитов В.М. Хламидиозы. М.–Н. Новгород: Медицинская книга, Изд-во НГМА, 2000. 192 р. [Granitov V.M. Chlamydia. *Moscow, Nizhny Novgorod: Medical Book, NSMA Publishing, 2000. 192 p. (In Russ.)*]
11. Гранитов В.М. Хламидиозы. М.: Мед. книга, 2002. 189 с. [Granitov V.M. Chlamydia. *Moscow: Medical Book, 2002. 189 p. (In Russ.)*]
12. Демченко Е.В., Иванченко Г.Ф., Прозоровская К.Н., Бочаров А.Ф., Бойкова Н.Э. Клиника и лечение хламидийного ларингита с применением амиксина // Вестник оториноларингологии. 2000. № 5. С. 58–60. [Demchenko E.V., Ivanchenko G.F., Prozorovskaya K.N., Bocharov A.F., Boikova N.E. Clinic and treatment of chlamydial laryngitis with Amixin. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology, 2000, no. 5, pp. 58–60. (In Russ.)*]
13. Зайцева О.В., Левшин И.Б., Лаврентьев А.В. Частота встречаемости и особенности течения бронхиальной астмы у детей, ассоциированной с Chlamydia pneumoniae // Педиатрия. 1999. № 1. С. 29–33. [Zaitseva O.V., Levshin I.B., Lavrent'ev A.V. The frequency of occurrence and course of bronchial asthma in children associated with Chlamydia pneumoniae. *Pediatriya = Pediatrics, 1999, no. 1, pp. 29–33. (In Russ.)*]
14. Запруднов А.М., Съемщикова Ю.П., Бадяева С.А., Рудинцева Н.В. Особенности хламидийной инфекции у детей с нефрологической, урологической и гинекологической патологией // Педиатрия. 1999. № 1. С. 23–26. [Zaprudnov A.M., S'emshchikova Y.P., Badiyeva S.A., Rudintseva N.V. Features of chlamydia infection in children with nephrological, urological and gynecological pathology. *Pediatriya = Pediatrics, 1999, no. 1, pp. 23–26. (In Russ.)*]
15. Карбон К., Пул М.Д. Значение новых макролидов при лечении внебольничных инфекций дыхательных путей: обзор экспериментальных и клинических данных // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. 2000. № 1. С. 47–58. [Karbon K., Poole M.D. The importance of new macrolides in the treatment of community-acquired respiratory tract infections: review of experimental and clinical data. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2000, no. 1, p. 47–58. (In Russ.)*]
16. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. М.: ЮНИТИ, 1995. 313 с. [Kozlova V.I., Puchner A.F. Viral, chlamydial and mycoplasmal diseases of the genitals. *Moscow: UNITY, 1995. 313 p. (In Russ.)*]
17. Кротов С.А., Кротова В.А., Юрьев С.Ю. Хламидиозы: эпидемиология, характеристика возбудителя, методы лабораторной диагностики, лечение генитального хламидиоза. Кольцово, 1997. 63 с. [Krotov S.A., Krotova V.A., Yuryev S.Yu. Chlamydia: epidemiology, characteristics of the pathogen, methods of laboratory diagnosis, treatment of genital chlamydia. *Koltsovo, 1997. 63 p. (In Russ.)*]
18. Линьков В.И., Цурикова Г.П., Нуралова И.В., Панькина Н.А. Значение хламидийной инфекции в развитии хронических воспалительных заболеваний глотки // Новости оториноларингологии и логопатологии. 1995. № 3 (4): 146. [Linkov V., Tsurikov G.P., Nuralova I.V., Pan'kina N.A. The value of chlamydia infection in the development of chronic inflammatory diseases of the pharynx. *Novosti otorinolaringologii i logopatologii = News of Otorhinolaryngology and Logopathology, 1995, no. 3 (4): 146. (In Russ.)*]
19. Лобзин Ю.В., Ляшенко Ю.И., Позняк А.Л. Хламидийные инфекции. СПб.: Фолиант, 2003. 396 с. [Lobzin Yu.V., Lyashenko Yu.I., Poznyak A.L. Chlamydial infections. *St. Petersburg: Foliant, 2003. 396 p. (In Russ.)*]
20. Мазанкова Л.Н. Хламидийная инфекция у детей // Медицинская помощь. 2002. № 2. С. 3–10. [Mazankova L.N. Chlamydia infection in children. *Meditsinskaya pomoshch' = Medical Care, 2002, no. 2, pp. 3–10. (In Russ.)*]
21. Маянский А.Н. Микробиология. Н. Новгород: НГМА, 1999. 392 с. [Mayansky A.N. Microbiology. *Nizhny Novgorod: NSMA Publishing, 1999. 392 p. (In Russ.)*]
22. Мортон Р.С., Кингхорн Д.Р. Урогенитальная хламидийная инфекция: переоценка данных и гипотезы // Инфекции, передаваемые половым путем. 2000. № 2. С. 4–15. [Morton R.S., Kinghorn D.R. Urogenital chlamydial infection: reassessment of data and hypotheses. *Infektsii, peredavaemye polovym putem = Sexually Transmitted Infections, 2000, no. 2, pp. 4–15. (In Russ.)*]
23. Немченко О.И., Плиева З.А., Уварова Е.В. Урогенитальный хламидиоз у девочек // Гинекология. 2004. № 1. С. 4–10. [Nemchenko O.I., Plieva Z.A., Uvarov E.V. Urogenital chlamydia in girls. *Ginekologija = Gynecology, 2004, no. 1, pp. 4–10. (In Russ.)*]
24. Парилова О.В., Капустина Т.А., Белова Е.В. Клинические особенности острого верхнечелюстного синусита, ассоциированного с хламидийной инфекцией // Российская оториноларингология. 2013. № 3 (64). С. 126–131. [Parilova O.V., Kapustina T.A., Belova E.V. Clinical features of acute maxillary sinusitis associated with chlamydial infection. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology, 2013, no. 3 (64), pp. 126–131. (In Russ.)*]

25. Парилова О.В., Капустина Т.А., Белова Е.В., Маркина А.Н. Эпидемиологические и иммунологические характеристики у взрослых лиц с хроническими воспалительными заболеваниями носа и околоносовых пазух, ассоциированных с хламидийной инфекцией // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10, № 2 (19). С. 179–187. [Parilova O.V., Kapustina T.A., Belova E.V., Markina A.N. Epidemiological and immunological characteristics of adult people with chronic inflammatory diseases of the nose and paranasal sinuses associated with chlamydial infection. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, vol. 10, no. 2 (19), pp. 179–187. (In Russ.)]
26. Погодин О.К. Хламидийная инфекция в акушерстве, гинекологии и перинатологии. Петрозаводск: ИнтелТек, 1997. 241 с. [Pogodin O.K. Chlamydial infection in obstetrics, gynecology and perinatology. *Petrozavodsk: IntelTek*, 1997. 241 p. (In Russ.)]
27. Позняк А.Л., Пониделко С.Н. Поражения ЛОР-органов у больных урогенитальными хламидиозами с системными проявлениями: диагностика, клиника, перспективы лечения // Новости оториноларингологии и логопатологии. 2001. № 1. С. 35–39. [Pozniak A.L., Ponedelko S.N. Lesions of the respiratory tract of patients with urogenital chlamydiosis with systemic manifestations: diagnosis, clinic and prospects for treatment. *Novosti otorinolaringologii i logopatologii = News of Otorhinolaryngology and Logopatology*, 2001, no. 1, pp. 35–39. (In Russ.)]
28. Ремезов А.П., Неверов В.А., Семенов Н.В. Хламидийные инфекции (клиника, диагностика, лечение). СПб., 1995. 38 с. [Remezov A.P., Neverov V.A., Semenov N.V. Chlamydial infections (clinic, diagnosis, treatment). *St. Petersburg*, 1995. 38 p. (In Russ.)]
29. Соколова О.В., Логачева Т.М., Дядик Т.Г., Малкоч А.В. Половая инфекция у детей // Лечащий врач. 2005. № 7. С. 23–26. [Sokolova O.V., Logacheva T.M., Dadic T.G., Malkoch A.V. Sexual infection in children. *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2005, no. 7, pp. 23–26. (In Russ.)]
30. Соловьев А.М. Состояние иммунной системы и эффективность иммунокорректирующего лечения больных с хронической персистирующей хламидийной инфекцией // Терапевтический архив. 1996. № 11. С. 51–53. [Soloviev A.M. State of the immune system and the effectiveness of immunocorrecting treatment of patients with chronic persistent chlamydial infection. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive*, 1996, no. 11, pp. 51–53. (In Russ.)]
31. Спичак Т.В., Катосова Л.К., Бобылев В.А. Проблемы диагностики и лечения респираторного хламидиоза у детей // Вопросы современной педиатрии. 2002. № 3. С. 77–81. [Spichak T.V., Katosova L.K., Bobylev V.A. Problems of diagnosis and treatment of respiratory chlamydia in children. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*, 2002, no. 3, pp. 77–81. (In Russ.)]
32. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей. М.: Боргес, 2002. 429 с. [Strachunsky L.S., Kozlov S.N. Modern antimicrobial chemotherapy: a guide for doctors. *Moscow: Borges*, 2002. 429 p. (In Russ.)]
33. Филин В.Ф., Рудинцева Н.В., Ситкина Л.Н. Инфекция, вызванная *Chlamidia trachomatis* у детей: частота выявления, диагностика и лечение // Педиатрия. 1999. № 1. С. 20–22. [Filin V.F., Rudintseva N.V., Sitkina L.N. Infection caused by *Chlamydia trachomatis* in children: prevalence, diagnosis and treatment. *Pediatriya = Pediatrics*, 1999, no. 1, pp. 20–22. (In Russ.)]
34. Хайтов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000. 428 с. [Khaitov R.M., Ignatieva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. *Moscow: Medicine*, 2000. 428 p. (In Russ.)]
35. Щербакова М.Ю., Самсыгина Г.А., Мурашко Е.В., Чульчина Т.Н. Инфекция *Chlamydia pneumoniae*: фактор риска развития атеросклероза // Педиатрия. 1999. № 1. С. 27–29. [Shcherbakova M.Y., Samsygina G.A., Murashko E.V., Chulchina T.N. *Chlamydia pneumoniae* infection: risk factor for atherosclerosis. *Pediatriya = Pediatrics*, 1999, no. 1, pp. 27–29. (In Russ.)]
36. Эдвардс С., Карне К. Оральный секс и передача невирусных ЗППП // Заболевания, передающиеся половым путем. 1998. № 6. С. 3–8. [Edwards S., Carne K. Oral sex and transmission of non-viral STDs. *Zabolevaniia, peredayushhiesia polovym putem = Sexually Transmitted Diseases*, 1998, no. 6, pp. 3–8. (In Russ.)]
37. Эйдельштейн И.А. Фундаментальные изменения в классификации хламидий и родственных им микроорганизмов порядка Chlamydiales // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 1999. № 1 (1). С. 5–11. [Eidelstein I.A. Fundamental changes in the classification of chlamydia and related microorganisms of the order Chlamydiales. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, no. 1 (1), pp. 5–11. (In Russ.)]
38. Balin B.J., Gerard H.C., Arking E.T., Appelt D.M., Branigan P.J., Abrams J.T. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *J. Med. Immunol.*, 1998, no. 187, pp. 3–42. doi: 10.1007/s004300050071
39. Ellis R.W. Infection and coronary heart disease. *J. Med. Microbiol.*, 1997, no. 48, pp. 535–539. doi: 10.1099/00222615-46-7-535
40. Hashiguchi K., Ogawa H., Susuci T., Kazuyama Y. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clin. Infect. Dis.*, 1992, no. 15, pp. 570–571. doi: 10.1093/clind/15.3.570
41. Money D.M., Hawes S.E., Eschenbach D.A. Antibodies to the *Chlamydia* 60 kd heat-shock protein are associated with laparoscopically confirmed perihepatitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1997, no. 176 (4), pp. 870–877. doi: 10.1016/s0002-9378(97)70613-6
42. Ogawa H., Fujisawa T., Kazuyama Y. Isolate of *Chlamydia pneumoniae* from Middle ear aspirates of otitis media with effusion: a case report. *J. Infect. Dis.*, 1993, no. 162, pp. 96–99. doi: 10.1093/infdis/162.4.1000
43. Park K.S., Dixon P.B., Richey C.M., Hook E.W. Spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* infection in untreated patients. *Sex. Transm. Dis.*, 1997, no. 24, pp. 229–235. doi: 10.1097/00007435-199704000-00008
44. Poikonen K., Lajunen T., Silvennoinen-Kassinen S., Paldanius M., Leinonen M., Saikku P. Susceptibility of human monocyte-macrophages to *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro is highly variable and associated with levels of soluble CD14 and *C. pneumoniae* IgA and human HSP-IgG antibodies in serum. *Scand. J. Immunol.*, 2008, no. 67, pp. 279–284. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02061.x
45. Roblin P.M., Hammerschlag M.R. Microbiologic efficacy of azithromycin and susceptibilities to azithromycin of isolates of *Chlamydia pneumoniae* and children with community acquired pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, no. 42 (1), pp. 194–196. doi: 10.1128/AAC.42.1.194

46. Shehme-Avni I., Lieterman D. Chlamydia pneumoniae — born with ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, 1995, no. 171, pp. 1274–1278. doi: 10.1093/infdis/171.5.1274
47. Yamada S. Chlamydia pneumoniae infection in children with lower respiratory tract infections. *Kurume Med. J.*, 1995, no. 42 (2), pp. 107–120. doi: 10.2739/kurumemedj.42.107

Авторы:

Маркина А.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии (группа патологии ЛОР-органов) НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Капустина Т.А., д.м.н., научный руководитель лаборатории клинической патофизиологии (группа патологии ЛОР-органов) НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Парилова О.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии (группа патологии ЛОР-органов) НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Белова Е.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии (группа патологии ЛОР-органов) НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Markina A.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Clinical Pathophysiology (Group for ENT-pathology), Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Kapustina T.A., PhD, MD (Medicine), Scientific Research Supervisor, Laboratory for Clinical Pathophysiology (Group for ENT-pathology), Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Parilova O.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Clinical Pathophysiology (Group for ENT-pathology), Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Belova E.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Clinical Pathophysiology (Group for ENT-pathology), Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.05.2019
Отправлена на доработку 04.04.2020
Принята к печати 14.09.2020

Received 31.05.2019
Revision received 04.04.2020
Accepted 14.09.2020

ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРИ ВИРУСНЫХ ЭНЦЕФАЛИТАХ И СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ У ДЕТЕЙ. II. СУДОРОЖНЫЙ СИНДРОМ

Л.А. Алексеева¹, Г.Ф. Железникова¹, Е.Ю. Горелик¹, Н.В. Скрипченко^{1,2},
А.А. Жирков¹

¹ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Во второй части обзора приведены новые сведения о факторах патогенеза судорожного синдрома у детей, в том числе о значительной роли вирусной инфекции в развитии судорог и эпилепсии (ЭПЛ) у детей, о чем свидетельствуют данные клинических и экспериментальных исследований. Различные формы судорожного синдрома, ассоциированного с вирусной инфекцией, включают фебрильные судороги и фебрильный эпилептический статус, острые симптоматические судороги при энцефалитах и постэнцефалитическую эпилепсию. Причинным фактором фебрильных судорог и фебрильного эпилептического статуса чаще всего является герпесвирус человека 6 типа, который выделен и при височной эпилепсии. Фебрильные судороги, и особенно фебрильный эпилептический статус, ассоциированы с развитием в дальнейшем эпилепсии. Особого внимания заслуживает эпилептический синдром, связанный с фебрильными инфекциями (FIRES), поражающий чаще детей школьного возраста и отличающийся крайне тяжелым течением и неблагоприятным исходом. Судорожный синдром ассоциирован с системным воспалением и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, повышающих проницаемость гематоэнцефалического барьера и функциональную активность резидентных клеток мозга, которые участвуют в генерации судорог и поддерживают эпилептогенез. С учетом ведущей роли воспаления в генезе судорожного синдрома цитокины и хемокины в последние десятилетия широко изучаются в качестве возможных прогностических критериев эпилептогенеза. Нейроспецифические белки исследуются как маркеры поражения клеток мозга при разных воспалительных заболеваниях центральной нервной системы. В первой части обзора были изложены современные сведения о системном и локальном ответе цитокинов/хемокинов при вирусных энцефалитах. Здесь представлены клинические исследования в основном за последние 5–7 лет с определением цитокинов/хемокинов и нейроспецифических белков у детей с разными формами судорожного синдрома, в том числе эпилепсией. Обсуждаются ассоциации уровня биомаркеров с клиническими параметрами болезни и возможность их использования в диагностике и прогнозе ее дальнейшего течения.

Ключевые слова: цитокины, хемокины, нейроспецифические белки, фебрильные судороги, эпилептический статус, эпилепсия, неонатальные судороги, FIRES, дети.

Адрес для переписки:

Железникова Галина Федоровна
197002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 9,
Детский научно-клинический центр инфекционных болезней.
Тел.: 8 905 267-41-32 (моб.).
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

Contacts:

Galina F. Zheleznikova
197002, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 9,
Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases.
Phone: +7 905 267-41-32 (mobile).
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

Для цитирования:

Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Горелик Е.Ю., Скрипченко Н.В.,
Жирков А.А. Цитокины и нейроспецифические белки при вирусных
энцефалитах и судорожном синдроме у детей. II. Судорожный
синдром // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 433–446.
doi: 10.15789/2220-7619-CAN-1449

Citation:

Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Gorelik E.Y., Skripchenko N.V., Zhirkov A.A.
Cytokines and neuro-specific proteins in viral encephalitis and convulsive
syndrome in children. II. Convulsive syndrome // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 433–446.
doi: 10.15789/2220-7619-CAN-1449

© Алексеева Л.А. и соавт., 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CAN-1449>

CYTOKINES AND NEURO-SPECIFIC PROTEINS IN VIRAL ENCEPHALITIS AND CONVULSIVE SYNDROME IN CHILDREN. II. CONVULSIVE SYNDROME

Alekseeva L.A.^a, Zheleznikova G.F.^a, Gorelik E.Y.^a, Skripchenko N.V.^{a,b}, Zhirkov A.A.^a

^a Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In this Section we provide new data on the pathogenetic factors in pediatric convulsive syndrome, including a prominent role of viral infection in developing seizures and epilepsy (EPL) in children, as evidenced by clinical and experimental studies. Various forms of convulsive syndrome associated with viral infection include febrile convulsions and febrile epileptic status, encephalitis-related acute symptomatic seizures, and postencephalitic epilepsy. The human herpesvirus-6 isolated in temporal lobe epilepsy is a frequent causative agent of febrile seizures and febrile epileptic status. Febrile seizures and, especially, febrile epileptic status are associated with further developing epilepsy. Of special note is the febrile infection-related epileptic syndrome (FIRES) more often affecting school-aged children and characterized by extremely severe course and unfavorable outcome. Convulsive syndrome is associated with systemic inflammation and overproduced pro-inflammatory cytokines that increase permeability of the blood-brain barrier and functional activity of brain-resident cells, which are involved in eliciting seizures and maintaining epileptogenesis. Taking into consideration the key role of inflammation underlying convulsive syndrome, in recent decades cytokines and chemokines have been widely studied as possible prognostic criteria for epileptogenesis. Neuron-specific proteins are examined as markers of brain cell damage in various inflammatory diseases of the central nervous system. The first Section of the review presented current understanding on systemic and local cytokine/chemokine response in viral encephalitis. Here we present clinical trials published within the last 5–7 years assessing cytokines/chemokines and neuron-specific proteins in children with various forms of convulsive syndrome, including epilepsy. Association between biomarker level and disease clinical parameters as well as potential for their use to diagnose and predict its further course are discussed.

Keywords: cytokines, chemokines, neurospecific proteins, febrile convulsions, epileptic status, epilepsy, neonatal convulsions, FIRES, children.

Вопросы этиопатогенеза судорожного синдрома

Инфекции, особенно вирусные, играют значительную роль в развитии судорог и эпилепсии (ЭПЛ) у детей, о чем свидетельствуют данные клинических и экспериментальных исследований, рассмотренные в недавнем обзоре [10]. Различные формы судорожного синдрома (СС), ассоциированного с вирусной инфекцией, включают фебрильные судороги и фебрильный эпилептический статус (ФЭС), острые симптоматические судороги при энцефалитах и пост-энцефалитическую ЭПЛ (ПЭЭПЛ) [3].

Фебрильные судороги (ФС), характерные для детей младшего возраста, обычно связаны с инфекциями вирусом гриппа А, респираторно-синцитиальным вирусом и аденовирусом, энтеровирусами, ротавирусом [8, 10]. Однако причинным фактором ФС, и особенно ФЭС (ФС продолжительностью более 30 минут), чаще всего служит HHV-6 (human herpesvirus-6) [10], что отмечено в том числе и в России [2, 7, 8]. Есть указания на причастность HHV-6 и к височной ЭПЛ (TLE [temporal lobe epilepsy]) [18]. Метаанализ данных 10 исследований [59] выявил присутствие ДНК HHV-6 в 22% образцов биопсии мозга пациентов с MTLE-HS (mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis) (n = 456) против 10,3% (p < 0,01) в образцах группы контроля (n = 136). Авторы заключили, что

HHV-6-инфекция может являться фактором риска развития MTLE, но причинная взаимосвязь и возможная патологическая роль HHV-6 в этом процессе еще не установлены.

Неоднократно подтверждено, что длительные и рецидивирующие ФС у детей могут приводить к развитию ЭПЛ в дальнейшем [2, 8]. В обзорах [18, 43] суммированы результаты исследований первой декады XXI в. по вопросам взаимосвязи между ФС и TLE, с акцентом на роль воспаления в генезе СС. Приводятся доказательства, что именно ФЭС, а не простые ФС является значительным фактором риска последующего развития TLE на фоне склероза гиппокампа.

С обычными инфекциями, сопровождающимися лихорадкой, связан также редкий эпилептический синдром FIRES (febrile infection-related epilepsy syndrome), развивающийся в основном у детей школьного возраста. Впервые этот синдром был описан в 1986 г. Awaya Y. и Fukuyama Y. и затем подтвержден в разных странах Европы и Азии. FIRES характеризуется тремя фазами болезни: инициальная — обычная острая респираторная или кишечная инфекция с лихорадкой, за которой через 2–14 дней следует острая фаза с частыми повторными фокальными судорогами и быстрым переходом в рефрактерный ЭС и затем, без латентного периода, в хроническую фазу лекарственно-устойчивой ЭПЛ (ЛУЭПЛ). Этиология и патогенетические механизмы

FIRES неясны, но предполагается триггерная роль инфекции в запуске патологического процесса [14]. Ретроспективный анализ 77 случаев FIRES у детей в возрасте от 2 до 17 лет показал, что в острой фазе болезни умерли 9 (12%) детей, а из 68 выживших 63 (93%) пациента в последующем имели ЛУЭПЛ [37]. В России также описан случай FIRES у ребенка на фоне персистирующей микст-инфекции герпесвирусами (HHV-6 и HSV [herpes simplex virus]) [7]. FIRES как внезапная и крайне тяжелая эпилептическая энцефалопатия (ЭП) у ранее здоровых детей, несмотря на редкую встречаемость, представляет серьезную проблему в детской неврологии. В недавнем обзоре van Baalen A. и соавт. [52] подчеркнули особую тяжесть исхода FIRES: летальный исход в острую фазу (до 30% случаев) или ЛУЭПЛ с нарастанием нейropsychологических нарушений и часто общей атрофией мозга. Обсуждая известные гипотезы патогенеза этой ЭП, авторы высказывают предположение, что FIRES является иммуноопосредованным (но не аутоиммунным) заболеванием, которое можно определить как «эпилептический синдром, ассоциированный с фульминантным иммунным ответом на инфекцию». Уточняя гипотезу о триггерной роли инфекции в патогенезе FIRES [14], Serino D. и соавт. [48] предположили, что системная инфекция при FIRES действует как триггер нейровоспалительного каскада, создавая замкнутый круг эпилептогенеза при условии предрасположенности мозга к этому процессу.

Развитие постэнцефалитической эпилепсии (ПЭЭПЛ) часто ассоциировано с герпесвирусами (ГВ) — возбудителями вирусного энцефалита (ВЭ). Прежде всего, это HSV, который у детей чаще всего является возбудителем ВЭ с манифестацией СС. HHV-6 также может стать причиной ВЭ с риском развития ПЭЭПЛ. При HHV-6-ВЭ обычная локализация поражения мозга такая же, как и в случае с HSV-1-ВЭ (преимущественно медиальные отделы височных долей) [3, 7], характерная также для наиболее часто встречающейся формы ЭПЛ у взрослых — MTLE [59].

Изучая значение этиологии энцефалита в оценке риска развития ПЭЭПЛ у детей, австралийские исследователи [44] проводили наблюдение (в среднем в течение 7 лет) за 147 детьми, перенесшими ВЭ, аутоиммунный энцефалит (АИЭ) или энцефалит неясной этиологии. Всего за время наблюдения ПЭЭПЛ была диагностирована у 31 (21%) пациента. Эпилептический статус (ЭС) в периоде острого энцефалита оказался наиболее сильным прогностическим критерием развития ПЭЭПЛ. Этиологическим фактором высокого риска развития ПЭЭПЛ был определен HSV-ВЭ: ПЭЭПЛ диагностиро-

вана у 6 из 9 (67%) детей, перенесших HSV-ВЭ, в то время как ПЭЭПЛ после энтеровирусного энцефалита был зафиксирован в 4 из 18 (22%), а после АИЭ — в 1 из 41 (2,4%) случая.

Предполагают, что в генезе СС участвует системный иммунный ответ на инфекцию с гиперпродукцией провоспалительных медиаторов, способных изменять проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и функциональную активность клеток ЦНС через модификацию рецепторов и ионных каналов, что приводит к повышенной возбудимости нейронов и возникновению судорог. С другой стороны, длительные повторные судороги сами вызывают «стерильное» воспаление, вовлекая мозг в эпилептогенез [10]. Адаптивный ответ мозга на повышенную возбудимость нейронов с участием иммунных клеток, сосудистых клеток и самих нейронов («нейрогенное нейровоспаление») может стать неадекватным, создавая «порочный круг» и усугубляя патологический процесс при ЭПЛ [60]. Имеются доказательства, что нейровоспаление, развивающееся в первый год жизни в ответ на иммунные стимулы или сами судороги, предрасполагает незрелый мозг к повышенной возбудимости в зрелом возрасте [54]. По результатам опытов на экспериментальных моделях ЭПЛ и данным, полученным у детей с ЛУЭПЛ, высказано предположение, что происходящие в начале жизни первые пролонгированные судороги, активируя глию и ГЭБ, создают условия для быстрого и усиленного ответа на вторичные приступы с ростом проницаемости ГЭБ и инфильтрацией в мозг макрофагов и Т-лимфоцитов. В результате развивается постоянное хроническое воспаление, которое закрепляет эпилептогенез в развивающемся мозге [35].

В последние десятилетия в нейробиологии достигнуто принципиально важное понимание тесной взаимосвязи астроцитов и нейронов в ходе обеспечения основных функций мозга, в связи с чем возникла необходимость пересмотра роли астроцитов в норме и патологии [4]. Формируется представление об особой роли астроцитов в эпилептогенезе. Показано, что астроциты, главные элементы защиты гомеостаза мозга, могут непосредственно участвовать в генезе судорог и ЭС. Длительная активация астроцитов ведет к снижению клиренса глутамата и его накоплению в синаптическом пространстве, что повышает риск эксайтотоксичности нейронов и генерации судорог. Воспалительные изменения астроцитов (астроглиоз) являются характерным признаком ЭПЛ [53]. Изучив образцы гиппокампа пациентов с MTLE-HS, Bedner P. и соавт. [12] впервые обнаружили в них полное отсутствие сцепления щелевых контактов (gap junction coupling)

и полноценных (*bona fide*) астроцитов, рассматривая эти изменения как ключевые события патогенеза MTLE-HS.

С учетом ключевой роли воспаления в генезе СС и ЭПЛ его главные медиаторы — цитокины (ЦК) и хемокины (ХК) — в последние десятилетия широко изучаются в качестве возможных прогностических критериев эпилептогенеза. В первой части обзора были изложены современные сведения о системном и локальном ответе ЦК/ХК при ВЭ [1]. Здесь будут представлены клинические наблюдения с определением ЦК/ХК и нейроспецифических белков (НСБ) у детей с разными формами СС, включая ЭПЛ.

Цитокины при судорожном синдроме

Иммунная система и ее воспалительные реакции играют важную роль в генезе СС. Уже в первой декаде XXI в. появились сообщения о том, что провоспалительные ЦК интерлейкин-1 β (IL-1 β), IL-6 и туморнекротизирующий фактор- α (TNF α), кроме своих классических функций регуляции иммунного ответа, обладают нейромодулирующими свойствами, включая влияние на синаптический перенос и возбудимость нейронов [55]. В опытах *in vivo* и *in vitro* показано, что IL-1 β , IL-6 и TNF α оказывают нейротоксический эффект и повышают судорожную готовность, тогда как ЦК с противовоспалительным действием IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) и IL-10 проявляют нейропротективный и антиконвульсантный эффекты [18, 43, 53]. По-видимому, ведущую роль в патогенезе СС играет IL-1 β , первый в каскаде ЦК врожденного иммунитета, индуцирующий продукцию TNF α , IL-6 и IL-1Ra. IL-1Ra, связываясь с рецептором IL-1 β I типа (IL-1RI), снижает биологическую активность IL-1 β . В экспериментальных моделях TLE показано, что астроциты из эпилептических очагов экспрессируют IL-1 β и его рецептор IL-1RI. На мышинной модели MTLE-HS установлено, что расцепление (*uncoupling*) астроцитов гиппокампа способен индуцировать IL-1 β , один или в комбинации с TNF α [12]. Выявлены особенности ответа IL-1 β в зависимости от типа нейропатологии при ЭПЛ у детей [54]. Важно, что другие потенциальные биомаркеры эпилептогенеза — HMGB1 (*high mobility group box 1*) и ROS (*reactive oxygen species*) — также косвенно связаны с продукцией провоспалительных ЦК. К примеру, ядерный белок HMGB1 ведет к высвобождению из активированных макрофагов IL-1 β , TNF α и IL-6, которые, в свою очередь, способны генерировать ROS, вызывающие гибель нейронов [34].

Роль ЦК в генезе СС подкрепляют сообщения о связи полиморфизма генов IL-1 β и IL-6 с предрасположенностью к ФС [15, 43, 46].

Важно отметить, что для гена IL-1 β определена возможная роль в предрасположенности одновременно к ФС и ЭПЛ [15, 43].

Источником ЦК при воспалительном процессе в ЦНС могут быть как клетки мозга, так и клетки системного иммунного ответа. Последнее связано с повышением проницаемости ГЭБ как пусковым механизмом нейровоспаления. В регуляции функций ГЭБ принимает участие глия, оказывая различное влияние за счет продуцируемых ЦК/ХК. К примеру, клетки микроглии (подобно макрофагам системного иммунитета) после активации приобретают два оппозитных фенотипа: клетки фенотипа M1 продуцируют провоспалительные ЦК/ХК (IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, CXCL10/IP-10 [IFN γ -induced peptide-10]), повреждающие ГЭБ, а фенотипа M2 — «восстанавливающие» ЦК с противовоспалительными свойствами (IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13) [13].

Для оценки состояния ГЭБ в хроническую фазу рефрактерной ЭПЛ Kimizu T. и соавт. [33] определили индекс альбумина ликвор/кровь (Qalb) у 60 пациентов с ПЭЭПЛ в возрасте от 2 до 29 лет (с преобладанием детей младше 10 лет) в сравнении с группой контроля — пациентами с ЭПЛ иной этиологии ($n = 97$). Значения Qalb у пациентов с ПЭЭПЛ и распространенным поражением мозга в МРТ-изображении оказались значительно выше, чем в группе контроля ($p = 0,001$). У детей в возрасте от 2 до 10 лет, составляющих основную часть пациентов с ПЭЭПЛ, удалось выявить наличие слабой положительной корреляции между значением Qalb и частотой судорожных припадков в месяц. Авторы заключают, что пациенты с ПЭЭПЛ имеют более тяжелую хроническую дисфункцию ГЭБ по сравнению с пациентами с ЭПЛ иной этиологии, предполагая ее вклад в клинические проявления ПЭЭПЛ.

Цитокины при фебрильных судорогах у детей

Определение ЦК в крови у детей с ФС, проведенное разными авторами в первой декаде XXI в., дало противоречивые результаты. Kwon A. и соавт. [39] предприняли метаанализ данных 6 исследований, охватывающих вместе 243 детей с ФС и 234 здоровых детей группы контроля. В объединенных группах детей с ФС метаанализ показал значительное накопление в крови пациентов IL-6 ($p < 0,01$), но не IL-1 β или TNF α , а в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) — IL-1 β ($p < 0,01$). Авторы подчеркивают важность временного интервала между приступом ФС и взятием пробы, который варьирует в разных исследованиях, отчасти определяя разноречивость полученных данных. Южнокорейские исследователи [17] сравнили содержание IL-1 β , TNF α , IL-6, IFN γ ,

IL-10 и HMGB1 в сыворотке крови, взятой через 30 минут после приступа у детей с ФС ($n = 41$) и детей группы контроля (лихорадка без ФС, $n = 41$). В группе пациентов с ФС большинство имели первую в жизни атаку ФС (28 из 41, 68%), остальные 13 (32%) — повторные ФС. Наблюдалась явная тенденция к росту уровней IL-1 β , TNF α и IL-10 у пациентов с повторными ФС по сравнению с пациентами с первичными, тогда как содержание в крови IL-6 и HMGB1 нарастало уже при первой атаке ФС. В большинстве случаев (27 из 41, 66%) ФС были простыми, у 14 пациентов (34%) — сложными. У детей с простыми ФС уровень IL-1 β в крови оказался в среднем в 4 раза, IL-6 — вдвое, а IL-10 — втрое выше, чем у детей в группе контроля лихорадки ($p < 0,05$). Не обнаружено существенных различий показателей у детей с простыми и сложными ФС, за исключением тенденции к росту уровня TNF α и, напротив, снижению уровня IL-10 у пациентов второй подгруппы. Позднее те же авторы [16] подтвердили, что и через 2 часа после приступа простых ФС ($n = 38$) сывороточные уровни IL-1 β , IL-6 и HMGB1 в 3–5 раз превышают показатели у детей группы контроля (лихорадка без ФС, $n = 20$).

Представляет интерес сопоставление ответа ЦК у детей с крайними значениями длительности приступов ФС: менее 15 минут (простые ФС) и более 30 минут (ФЭС). Ни М. и соавт. [27] сравнили содержание 13 ЦК в плазме 9 детей с простыми ФС и 21 — с тяжелым острым энцефалитом (ОЭ), из которых 16 (76%) имели судороги. Забор крови производили при поступлении пациентов с ФС или на пике симптомов у пациентов с ОЭ. Концентрации IL-6, IFN γ и IL-10 оказались значительно выше у пациентов с ФС, чем с тяжелым ОЭ, при отсутствии различий по уровню TNF α , IL-13, IL-4, IL-22, IL-9, IL-2 и IL-12p70. При ФС наблюдали также некоторый подъем в крови уровней IL-1 β , IL-17A и IL-5, тогда как у большинства пациентов с тяжелым ОЭ они не превышали порог чувствительности метода. Авторы предположили, что при тяжелом ОЭ происходит дисрегуляция цитокиновой сети, тогда как подъем в крови ряда ЦК, особенно IL-6, у детей с простыми ФС носит компенсаторный характер.

Южнокорейские исследователи [32] определили содержание 7 ЦК (IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1Ra) в плазме крови 50 детей (от 6 мес. до 5 лет) с простыми ФС и пациентов групп сравнения — детей с острой инфекцией и лихорадкой без ФС (контроль, $n = 39$) и детей с лихорадкой без ФС, но с ФС в анамнезе ($n = 13$). Взятие крови осуществляли через 1 час после приступа. В основной группе с ФС заметно повышенными были уровни IFN γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-1Ra. Средний уровень IL-8 был

втрое выше у детей с ФС, чем с лихорадкой без ФС. Концентрации IL-10 и IL-1Ra в основной группе также значительно превышали показатели в группах сравнения, тогда как уровень IL-1 β был низким, без существенных различий между группами. Авторы делают акцент на компенсаторном подъеме продукции ЦК с противовоспалительными свойствами IL-10 и IL-1Ra, рассматривая IL-1Ra как более надежный биомаркер ФС, чем мишень его негативной регуляции — IL-1 β . В дополнение та же группа исследователей показала, что концентрации TNF α и IL-4 через 1 час после приступа также значительно выше у детей с простыми ФС, чем с лихорадкой без ФС ($p < 0,05$) [23].

Мы обнаружили только два сообщения, касающиеся ответа ЦК у детей с ФЭС. Еще в конце первой декады XXI в. Ichiyama Т. и соавт. [28] оценили системный и локальный ответ 7 ЦК (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, sTNFR1 [soluble TNF receptor 1]) у 23 детей (от 8 мес. до 8 лет) с ФЭС и 13 детей (от 7 мес. до 2 лет) с острой энцефалопатией (ОЭП), следующей после ФЭС. Забор крови и ЦСЖ осуществляли при поступлении в стационар. Уровни IL-6, IL-10 и sTNFR1 в сыворотке крови и IL-6 в ЦСЖ оказались значительно выше ($p < 0,0001$) у пациентов обеих групп по сравнению с показателями в группах контроля (здоровые дети и дети без инфекции в ЦНС, для сыворотки и ЦСЖ соответственно). Сывороточные концентрации IL-6, IL-10 и sTNFR1 у детей с ФЭС и ОЭП не различались, однако уровень IL-6 в ЦСЖ был значительно выше при ОЭП, чем при ФЭС без ОЭП, причем содержание IL-6 в ЦСЖ только у детей с ОЭП значительно превышало его уровень в сыворотке. По-видимому, это отражает активное участие резидентных клеток мозга в продукции IL-6 именно при ОЭП, но не ФЭС. Авторы особо отмечают отсутствие у пациентов обеих групп подъема в крови IFN γ и TNF α , что может означать дефицит протективного ответа Th1-типа против вируса-возбудителя как у детей с ФЭС, так и с ФЭС, осложненным ОЭП.

Изучая патогенез установленной ранее взаимосвязи между ФЭС и развитием височной ЭПЛ (MTLE), особенно в случаях острого поражения гиппокампа, исследователи из США [21] определили в мультиплекс-тесте концентрации 30 ЦК/ХК в плазме крови 33 детей с ФЭС (в возрасте до 6 лет) в сравнении с группой контроля — 17 детей с лихорадкой без ФС. В течение 72 часов после ФЭС обнаружен значительный ($p < 0,001$) рост содержания в плазме IL-8 и EGF (epidermal growth factor), тогда как содержание sIL-2R (soluble interleukin-2 receptor), VEGF (vascular endothelial growth factor) и G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) было гораз-

до ниже, чем у детей группы контроля. С меньшей степенью достоверности ($p < 0,05$) уровни $IFN\alpha$, ХК $CCL11/Eotaxin$, макрофагальных воспалительных протеинов $CCL3/MIP-1\alpha$ и $CCL4/MIP-1\beta$ были выше, а ХК, индуцированных $IFN\gamma$ ($CXCL10/IP-10$ и $CXCL9/MIG$), и $IL-1Ra$ — ниже у детей с ФЭС, чем в группе контроля. Авторы подчеркнули высокую информативность коэффициента соотношений уровней $IL-1Ra$ и провоспалительных ЦК у детей с ФС. Дети с ФЭС имели достоверно сниженные соотношения $IL-1Ra/IL-1\beta$, $IL-1Ra/IL-8$ и $IL-1Ra/IL-6$. Кроме того, разделение детей с ФЭС на имеющих признаки поражения гиппокампа (гиперинтенсивность сигнала через 72 часа после приступа в режиме T2 МРТ) и не имеющих таковых показало, что в первой подгруппе ($n = 5$) значительно выше уровни $IL-6$ и $IL-8$ в плазме при более низких коэффициентах $IL-1Ra/IL-6$ и $IL-1Ra/IL-8$, чем во второй ($n = 27$). Из этих 4 параметров только снижение $IL-1Ra/IL-6$ надежно предсказывало изменения в гиппокампе после приступа ФЭС.

Сравнивая системный ответ ЦК у детей с простыми ФС или ФЭС в двух работах сходного дизайна, отметим, что дети с простыми ФС при поступлении в стационар имели более адекватный иммунный ответ против вируса-возбудителя с подъемом в крови уровней $IFN\gamma$, $IL-6$ и $IL-10$, отличающий их от пациентов с ОЭ [27], тогда как содержание в крови $IL-6$ и $IL-10$ у детей с ФЭС и ОЭП было одинаковым, а подъем в крови $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ отсутствовал у пациентов обеих групп, что, вероятно, отражает дефицит протективного иммунного ответа Th1-типа не только при ОЭП, но и ФЭС [28]. Интенсивное накопление в крови ряда ЦК происходило через 30 минут — 2 часа после приступа простых ФС (при сравнении с показателями у детей с лихорадкой без ФС) [17, 23, 27, 32]. С другой стороны, в течение 72 часов после ФЭС в крови пациентов наблюдали только рост уровня $IL-8$ при снижении $IL-Ra$ и коэффициента соотношений уровней $IL-Ra$ и провоспалительных ЦК ($IL-1\beta$, $IL-6$ и $IL-8$) в ассоциации с изменениями гиппокампа в МРТ [21]. Проведенное нами сопоставление подтверждает правомерность предположений авторов о том, что простые ФС вызывают адаптивный ответ клеток ЦНС, быстро стимулируя синтез про- и противовоспалительных ЦК врожденного иммунитета [27, 32], тогда как ФЭС ассоциирован с изначальным нарушением противовирусного иммунного ответа [28] и смещением баланса ЦК в сторону продукции медиаторов воспаления, что может способствовать поражению чувствительных структур в ЦНС [21].

Отдельно следует упомянуть исследование Bartolini L. и соавт. [11], которые сравнили содер-

жание $IL-1\beta$, $TNF\alpha$, $IL-8$, $IL-6$, $IL-10$, $IL-12p70$ в слюне детей с приступом судорог (вместе ФС и АФС), взятой в течение 24 часов после приступа (основная группа, $n = 32$), или с лихорадкой без судорог (контроль лихорадки, $n = 30$). У большинства пациентов основной группы (78%) судороги были простыми, продолжительностью менее 5 минут. Установлено, что содержание $IL-8$ и $IL-1\beta$ в слюне пациентов основной группы значительно выше, чем в слюне пациентов контрольной ($p < 0,05$). Концентрации всех остальных ЦК оказались одинаково низкими в обеих группах детей. Установлена прямая зависимость уровней $IL-8$ и $IL-1\beta$ от возраста детей, а также положительная корреляция между вирусной нагрузкой ННВ-6В и уровнем $IL-1\beta$ ($p = 0,007$). В целом эти данные подтверждают участие инфекции ННВ-6В в локальном ответе ЦК ($IL-8$ и $IL-1\beta$) при судорогах (чаще ФС) у детей. Однако остается открытым вопрос о соотношении уровней ЦК в слюне и крови пациентов.

Особый интерес представляют особенности ответа ЦК при редком, но тяжелом эпилептическом синдроме FIRES, при котором рефрактерный ЭС переходит в стадию ЛУЭПЛ без латентного периода, характерного для ПЭЭПЛ [14, 37, 52]. Японские авторы изучили содержание 30 ЦК/ХК в сыворотке и ЦСЖ 14 детей с FIRES в период от 0 до 39 дней от начала неврологических симптомов [47]. В группу сравнения вошли 14 детей с другими воспалительными неврологическими заболеваниями (OIND), а в группу контроля — 18 детей без воспалительных неврологических заболеваний (NIND). Обнаружен особенно значительный рост уровней $IL-6$, $IL-8$ и $CXCL10/IP-10$ при FIRES по сравнению с NIND, отмеченный в обеих средах, но более выраженный в ЦСЖ, чем в сыворотке. Однако при сравнении с показателями группы OIND только уровень ХК $CXCL10$ в сыворотке был значимо выше у детей с FIRES, тогда как в ЦСЖ концентрации $IL-6$, $IL-8$ и $CXCL10$ у детей в группах FIRES и OIND не различались. Недавно Kothur K. и соавт. [36] определили содержание 32 ЦК/ХК в ЦСЖ детей с FIRES ($n = 6$) и ФЭС ($n = 8$) и сравнили его с данными пациентов с энцефалитом ($n = 43$) и контрольной группы (NIND, $n = 20$) в первые-вторые сутки от начала судорог. Был обнаружен значительный рост в ЦСЖ уровней ЦК/ХК, ассоциированных с Th1 ($TNF\alpha$, $CXCL9/MIG$ (monokine induced by $IFN\gamma$), $CXCL10/IP-10$, $CXCL11/I-TAC$ [$IFN\gamma$ -induced T-cell α -chemoattractant]), а также $IL-6$, $CCL2/MCP-1$ (monocyte chemotactic protein-1) и $CCL19/MIP-3\beta$ (macrophage inflammation protein-3 β) у детей с FIRES и, в меньшей степени, с ФЭС, по сравнению с NIND, тогда как у пациентов с энцефалитом отмечали подъем в ЦСЖ гораздо большего набора ЦК/ХК.

Цитокины при эпилепсии

Неспровоцированные приступы афебрильных судорог (АФС) являются основным клиническим проявлением хронической ЭПЛ у детей и взрослых. В приведенных выше работах [23, 32] авторы сравнили сывороточные уровни ЦК в двух группах детей с простыми судорогами — ФС и АФС. Через 1 час после приступа уровни в крови $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 и IL-1Ra у пациентов с АФС были значительно ниже, чем при ФС. Ранее другие авторы [17] обнаружили, что через 30 минут после атаки АФС длительностью более 30 минут (эпилептический статус, ЭС) у детей с ЛУЭПЛ ($n = 12$) содержание в крови IL-1 β было в 12 раз выше, $TNF\alpha$ — в 4 раза выше, а IL-10, напротив, в 4,5 раза ниже, чем у детей контрольной группы (дети без лихорадки и судорог, $n = 7$). Это отличало ЭС от простых АФС ($n = 6$), после которых уровни IL-1 β , IL-6 и $TNF\alpha$ не превышали значения в группе контроля. Позднее эти же авторы [16] подтвердили, что и через 2 часа после приступа простых АФС у детей с ЭПЛ ($n = 10$) показатели IL-1 β , IL-6 и HMGB1 были лишь незначительно выше показателей в группе контроля. Еще в одном упомянутом исследовании [36] был определен уровень 32 ЦК/ХК в ЦСЖ детей с ЭС ($n = 8$) и хронической ЭПЛ ($n = 21$) наряду с другими группами пациентов (см. выше). Содержание в ликворе ХК CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC и CCL19/MIP-3 β при ЭС оказалось значительно ниже, чем при ФЭС, хотя продолжительность приступов и сроки забора ЦСЖ не различались. По сравнению с детьми группы контроля (NIND), у пациентов с хронической ЭПЛ, несмотря на ежедневные приступы судорог, не обнаружено значительных изменений интрацеребрального уровня ЦК/ХК.

Особо выделяют неонатальные судороги (НС), которые обычно развиваются в периоде новорожденности (чаще в первую неделю жизни) как следствие перинатального гипоксически-ишемического (ГИ) повреждения мозга и в 20–56% случаев (по данным разных авторов) связаны с развитием ЭПЛ в течение двух лет [5]. Наблюдение в течение 7 лет за 85 детьми с НС выявило развитие ЭПЛ у 15 (18%), причем у 9 из 15 (60%) «постнеонатальная» ЭПЛ диагностирована уже на первом месяце жизни [45].

Изучая роль ЦК в патогенезе НС, Youn Y. и соавт. [62] определили концентрации 10 ЦК в сыворотке крови 13 новорожденных с НС при ГИ-энцефалопатии (ЭП) и, в качестве контроля, у 15 здоровых новорожденных. Через 24 часа после поступления у пациентов с НС оказался повышенным уровень IL-8 (в 7 раз, по средним данным), который втрое снижался через 48–72 часа, но все еще вдвое превышал уровень

контроля ($p < 0,05$). Через 48–72 часа у пациентов с НС наблюдали также 3-кратный рост в крови уровня IL-10 и, напротив, снижение уровня IL-1Ra вдвое по сравнению с контрольными показателями ($p < 0,05$). Авторы рекомендуют использовать определение IL-8 в крови в качестве раннего биомаркера НС у новорожденных. Позднее Numis A. и соавт. [42] сравнили уровни 7 ЦК в крови 26 новорожденных с ГИ-ЭП, имеющих НС ($n = 15$) или без НС ($n = 11$). У новорожденных с НС были значительно ($p < 0,05$) выше концентрации IL-1, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13 и $TNF\alpha$, но ниже уровень IL-12, чем у детей без НС. Наблюдение за 17 из 26 детей этой группы в течение 2 лет показало, что у 4 из 17 (23,5%) развилась ЭПЛ. Авторы сообщают, что у этих 4 детей после рождения было повышено содержание в крови ЦК сигнального пути IL-1 β (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$), а также IL-9, но не IL-12 и IL-13, в отличие от детей этой же группы без развития ЭПЛ в срок наблюдения.

В обсуждении возможных патогенетических механизмов развития ЭПЛ у детей авторы обзора [56] высказывают предположение об участии провоспалительных ЦК не только в эпилептогенезе, но и в формировании устойчивости к обычным противосудорожным препаратам. Изучая роль хронического воспаления в патогенезе ЛУЭПЛ у детей, Ishikawa N. и соавт. [29] сравнили содержание ЦК IL-1 β , IL-6, $TNF\alpha$ и CRP (C-reactive protein) в сыворотке крови 29 детей с ЛУЭПЛ и 15 детей группы контроля (дети без судорог и лихорадки). По частоте генерализованных моторных судорог пациенты с ЭПЛ были разделены на две подгруппы: 1 — с ежедневными приступами ($n = 12$) и 2 — со спорадическими приступами реже чем 1 раз в месяц ($n = 17$). В 1-й подгруппе оказались достоверно повышенными уровни IL-6 (но не IL-1 β и $TNF\alpha$) и CRP в сравнении с показателями во 2-й подгруппе и группе контроля. Авторы предположили, что ежедневные судороги вызывают рост в крови уровня IL-6, который стимулирует продукцию известного маркера воспаления — CRP.

В поисках биомаркеров прогноза течения ЭПЛ у детей китайские авторы [49] определили содержание IL-1 β и EPO (erythropoietin) в ЦСЖ 85 детей в возрасте от 6 месяцев до 12 лет с ранее не диагностированной и не леченной идиопатической ЭПЛ. Концентрации IL-1 β и EPO при поступлении оказались значительно выше ($p < 0,01$) показателей в группе контроля, что придает этим параметрам диагностическую значимость. С той же целью Zhu M. и соавт. [63] определили концентрации IL-1 β и HMGB1 в сыворотке крови у 180 детей с «новой» (new-onset) ЭПЛ и 40 здоровых детей. В пределах 24 часов после эпизода судорог уровни IL-1 β и HMGB1

у детей с ЭПЛ были значительно выше, чем в группе контроля. Наблюдение в течение 18 месяцев после первого приступа судорог и анализ данных показали прогностическую значимость обоих исследуемых биомаркеров в отношении частоты припадков (и других критериев тяжести) у детей с дебютом ЭПЛ.

Следует отметить характерный подъем IL-1 β в ЦСЖ [49] и крови [63] после приступа судорог в начальной стадии ЭПЛ у детей, тогда как в хроническую фазу ЭПЛ он чаще отсутствует [29, 36]. Однако ведущую роль IL-1 β не только в дебюте, но и поддержании патологического процесса при ЭПЛ подтверждают сообщения об успешной анти-IL-1 β терапии тяжелых ЭПЛ или ЭС у детей [20, 31]. Описан случай генерализованной ЛУЭПЛ, проявляющейся ежедневными припадками (от 4 до 15 в день), у 14-летней девочки, без признаков аутоиммунного или генетического заболевания [20]. В курсе терапии авторы применили блокаду IL-1 β с помощью двух препаратов — Анакинры (рекомбинантного IL-1Ra) и затем Канакинумаба (моноклональных антител к IL-1 β). Результатом было почти полное исчезновение припадков и значительное улучшение качества жизни пациентки. Известен также случай положительного эффекта длительного (более 1 года) лечения Анакинрой тяжелого ЭС, развившегося после FRES у 32-месячной девочки [31]. До лечения Анакинрой в ЦСЖ (но не в сыворотке) концентрации IL-8 и IL-6 были экстремально высокими, снижаясь до нормы на 9-м месяце терапии. В конце курса Анакинры у ребенка сохранялись лишь редкие фокальные судороги. Эффект терапии Анакинрой объясняется блокадой IL-1RI с прерыванием нисходящих от IL-1 β сигнальных путей, отвечающих за продукцию в ЦНС провоспалительных ЦК TNF α , IL-8 и IL-6 [20, 31].

В двух сообщениях приведены результаты оценки сывороточных уровней ЦК у подростков и взрослых с ЭПЛ. Турецкие исследователи [51] определили концентрации IL-1 β , IL-1Ra и IL-6 в сыворотке крови 23 пациентов в возрасте от 15 до 45 лет с ЭПЛ трех типов: височной ЭПЛ (TLE, n = 6), ЭПЛ других долей мозга (XLE, n = 8) и идиопатической генерализованной ЭПЛ (IGE, n = 9). Забор крови осуществляли до приступа (базальный уровень) и после приступа — сразу и через 3, 6, 12 и 24 часа. Во всех трех группах базальный уровень IL-6 не отличался от нормы, тогда как у пациентов с XLE или IGE (но не TLE) базальный уровень IL-1 β был выше, а IL-1Ra — ниже нормы (p < 0,05). Обнаружен значительный рост содержания в крови IL-6 и IL-1Ra через 12 часов после приступа, уровень IL-1 β при этом оставался без изменений. При этом соотношение IL-1 β /IL-1Ra снижалось уже через 3 часа

после приступа ЭПЛ (p = 0,03). Накопление в циркуляции IL-6 и IL-1Ra не зависело от типа ЭПЛ, но было особенно выраженным у пациентов с более высоким базальным уровнем IL-1 β и низким IL-1Ra. Позднее финские авторы [9] сравнили сывороточные концентрации IL-6 у 45 пациентов в возрасте от 16 до 58 лет с хронической рефрактерной ЭПЛ (TLE, n = 23 и XLE, n = 22) до и после (3–24 часа) приступа. Подъем концентраций IL-6 относительно базального уровня был значительно выше при TLE, чем XLE, причем у пациентов с TLE он был особенно высок при низком исходном уровне IL-6 и относительно редкой частоте приступов в течение последнего года.

Публикации последнего десятилетия акцентируют внимание на участии в эпилептогенезе провоспалительного ЦК IL-17 (IL-17A), продуцируемого не только Т-клетками адаптивного иммунитета (Th17), но и $\gamma\delta$ Т-клетками. Есть сообщение о подъеме уровня IL-17A в крови при хронической ЭПЛ у взрослых, в корреляции с частотой и тяжестью приступов [40].

В ряде исследований изучено состояние системы IL-17/IL-17R в патологически измененных зонах коры мозга у детей с хронической ЛУЭПЛ различного генеза, подвергнутых хирургической резекции этих участков. Изучены хирургические образцы коры мозга детей с ЛУЭПЛ, вызванной нарушением кортикального развития [25] или генетическим заболеванием [26]. Среди нарушений кортикального развития у детей с ЛУЭПЛ преобладают фокальные кортикальные дисплазии (ФКД, FCD) разных типов, при которых ЭПЛ манифестирует в возрасте от нескольких недель до 7 лет [6]. Не J. и соавт. [25] исследовали 39 образцов коры головного мозга детей с ЛУЭПЛ в возрасте от 1,2 до 11,5 лет с тремя типами FCD: FCDIa (n = 15), FCDIIa (n = 12 и FCDIIb (n = 12). Контрольные образцы были получены при аутопсии 10 пациентов в возрасте от 2 до 11 лет без заболеваний ЦНС. Содержание IL-17 и IL-17R в образцах коры головного мозга пациентов с FCD всех трех типов было значительно выше, чем в контрольных образцах. Более того, уровни IL-17 и IL-17R у детей с FCD позитивно коррелировали с частотой судорог до операции (p < 0,01). Обнаружена высокая экспрессия IL-17 и IL-17R в нейрональных микроколках, дисморфических нейронах, баллонных клетках, астроцитах и клетках сосудистого эндотелия.

Генетическая аутосомно-доминантная болезнь — туберозно-склерозный комплекс (TSC), возникает в результате мутации одного из двух генов: TSC1 (ген гамартина) или TSC2 (ген туберина), характеризуясь образованием гамартом в разных органах, включая мозг. Кортикальные

узлы (tubers) TSC представляют собой области FCD с нарушением нормальной 6-слойной структуры коры, астроглиозом, наличием измененных клеток — диспластических нейронов (DN) и гигантских клеток (GC) [26]. Не J. и соавт. [26] изучили экспрессию IL-17 и IL-17R в хирургических образцах TSC от 16 пациентов с ЛУЭПЛ в возрасте от 2 до 11 лет и сравнили полученные показатели с соответствующими показателями контрольных образцов коры мозга. Обнаружена повышенная экспрессия IL-17 и IL-17R в кортикальных узлах TSC, при этом IL-17R экспрессировали DN и GC, а также клетки глии и эндотелия сосудов. В образцах TSC присутствовали CD4⁺ (но не CD8⁺) Т-клетки-продуценты IL-17 (Th17). Результаты этих двух исследований [25, 26] подтверждают гипотезу об участии системы IL-17/IL-17R в развитии ЛУЭПЛ у детей с FCD или TSC.

Исследователи из США [61] изучили методом цветной цитометрии клеточный состав лейкоцитарного инфильтрата в хирургических образцах мозга от 29 детей с ЛУЭПЛ (FCD, n = 10) и энцефаломалацией (ЭМ, n = 19). У пациентов обеих групп обнаружена значительная инфильтрация мозга антиген-представляющими клетками (АПК) и Т-лимфоцитами. При этом количество АПК в эпилептогенной зоне мозга у пациентов с тяжелым течением ЭПЛ было в 40 раз выше, чем у больных с менее тяжелым течением, в прямой корреляции с общим числом CD3⁺ Т-клеток. Кроме обычных αβТ-клеток, образцы содержали γδТ-клетки, число которых позитивно коррелировало с тяжестью ЭПЛ у пациентов с ЭМ. В обеих группах клетки-продуценты IL-6 и TNFα присутствовали среди АПК и астроцитов (но не микроглии), αβCD4⁺ Т-клетки и γδТ-клетки продуцировали IFNγ, TNFα, IL-17 и GM-CSF. Обнаружение не только CD4⁺Th (Th17), но и γδТ-клеток, продуцирующих IL-17, с учетом индукции этим ЦК гипервозбудимости нейронов в культуре, открывает еще один возможный механизм эпилептогенеза за счет взаимодействия с нормальными нейронами γδТ-клеток, которые, в отличие от обычных αβТ-клеток, распознают стрессиндуцированные аутопротеины на поверхности клеток-мишеней без участия МНС (главного комплекса гистосовместимости), отсутствующего на нормальных нейронах.

Недавно Kumar P. и соавт. [38] предприняли с помощью новой технологии CyTOF (Cytometry by Time of Flight) комплексное исследование субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей трех групп: 10 пациентов с рефрактерной ЭПЛ, 10 — с острым АИЭ и 12 здоровых детей (группа контроля). Были обнаружены отклонения в распределе-

нии субпопуляций лимфоцитов у детей с ЭПЛ или АИЭ при сравнении с группой контроля. В частности, у пациентов обеих групп отмечена экспансия провоспалительной субпопуляции CD4⁺IL-17⁺ Т-клеток, которые отличались от Th17 обычного фенотипа и не экспрессировали гранзима В, эффекторной молекулы цитотоксичности. Кроме того, у детей с ЭПЛ (но не АИЭ) обнаружена уникальная субпопуляция нормальных киллеров (NK), экспрессирующих гранзим В и продуцирующих TNFα, IFNγ и IL-21 (один из ЦК Th17). Полученные данные демонстрируют перестройку иммунной системы, ведущую к усилению провоспалительных функций в сети субпопуляций иммунных клеток и вносящую свой вклад в патогенез судорог и ЭПЛ у детей.

Анализируя результаты 66 исследований ЦК при ЭПЛ, опубликованных до 2015 г., de Vries E. и соавт. [19] констатировали, что подъем ЦК/ХК неодинаково выражен в разных биосредах. Так, повышение уровня IL-6 и IL-17 отмечали в сыворотке и ЦСЖ, IL-1β и IL-10 — в ЦСЖ, тогда как ХК CCL2-5 и CX3CL1 (фракталкин) обнаруживали преимущественно в тканях мозга пациентов с ЭПЛ. Авторы предположили, что ЦК можно рассматривать как общие маркеры воспаления на местном и системном уровнях, тогда как ХК участвуют в образовании эпилептогенных очагов в ЦНС.

Мы не нашли сообщений об исследовании продукции ЦК при симптоматической ЭПЛ, связанной с перенесенным ранее ВЭ (ПЭЭПЛ).

Нейроспецифические белки при судорожном синдроме

Резидентные клетки мозга продуцируют специфические белки, которые в условиях интактного ГЭБ не выходят за пределы ЦНС, но с увеличением проницаемости ГЭБ диффундируют в кровь согласно градиенту концентраций. Поэтому появление НСБ в крови наблюдается при различных заболеваниях ЦНС, а отдельные НСБ могут служить специфическими маркерами повреждения тех или иных клеток мозга. В последние десятилетия активно изучается клиническая информативность сывороточных уровней НСБ, особенно NSE (neuron-specific enolase) и кальций-связывающего белка S-100B, маркеров повреждения нейронов и клеток глии соответственно, при воспалительных и дегенеративных заболеваниях мозга, включая ЭПЛ [57]. NSE — это гликолитический фермент, присутствующий в нейрональных и нейроэндокринных тканях и способный в малых дозах усиливать нейропротекцию, а в больших — нейровоспаление. NSE представлена в двух димерных изоформах — γγ или αγ, причем γγ

форма NSE обильно представлена в нейронах, тогда как $\alpha\gamma$ форма — в астроцитах, микроглии и олигодендроцитах. Установлена связь повышенного сывороточного уровня NSE с неблагоприятным исходом ряда неврологических заболеваний [24]. Белок S-100B, главным источником которого в ЦНС являются астроциты, относят, наряду с ядерным протеином HMGB1, к «сигналам опасности», которые выделяют клетки глии во время судорог, вызывая «стерильное воспаление» мозга через активацию TLR (Toll-like receptors) на клетках-мишенях, вследствие чего происходят функциональные изменения в ЦНС [58]. Сывороточный уровень S-100B считают наиболее перспективным биомаркером нарушения ГЭБ при СС у детей, так как его содержание в сыворотке прямо коррелирует с величиной Qalb, характеризующей проницаемость ГЭБ [56].

Концентрации НСБ в крови и ЦСЖ у детей с ФС, по-видимому, не возрастают, о чем свидетельствуют результаты исследований, проведенных в разных странах [41, 50]. Mikkonen K. и соавт. [41] определили содержание S-100B в сыворотке крови и ЦСЖ 103 детей младше 4 лет с их первыми ФС, при этом 39 из них имели сложные ФС (> 15 минут), а у 66 наблюдали повторный приступ ФС (один или более). Для контроля уровня S-100B в крови обследованы 33 ребенка с острыми инфекциями без ФС. Авторы не обнаружили значимых различий уровня S-100B (в сыворотке и ЦСЖ) у детей с ФС и пациентов группы контроля, у пациентов с простыми или сложными ФС, а также у пациентов с повторными ФС или без них. Выявлено снижение уровня S-100B (в сыворотке, но не ЦСЖ) с возрастом пациентов, вне зависимости от тяжести ФС или их повтора. Shiihara T. и соавт. [50], оценивая диагностическую информативность NSE, S-100B и тау-протеина (tau) (маркера повреждения аксонов), обследовали детей с ФС (n = 51) и, в качестве контроля, детей без патологии ЦНС (n = 85). Не обнаружено различий уровня NSE, S-100B и tau в сыворотке, а также S-100B и tau в ЦСЖ у детей с ФС и детей группы контроля.

Вероятно, только приступы судорог длительностью более 30 минут (ЭС) приводят к подъему содержания S-100B в кровотоке, о чем недавно сообщили Gunawan P. и соавт. [22]. Были обследованы 24 ребенка с ЭС и, для сравнения, 22 ребенка с простыми ФС. Уровень S-100B в сыворотке определяли через 24 часа после приступа. Содержание S-100B у пациентов с ЭС оказалось значительно выше, чем у детей с ФС ($p < 0,05$). Кроме того, в основной группе выявлена сильная позитивная корреляция ($p < 0,001$) между уровнем S-100B и степенью энцефалопатии, установленной по результатам МРТ мозга.

Содержание НСБ в крови или ЦСЖ детей с ЭПЛ было изучено в единичных работах. Польские авторы [30] сравнили сывороточные концентрации S-100B и NSE у 56 пациентов (в возрасте от 1 месяца до 18 лет) с пароксизмальными нарушениями сна (парасомнией) (n = 16) или парасомнией на фоне ЭПЛ (n = 29). В группе с ЭПЛ 11 детей имели клинические приступы судорог во время полисомнографической регистрации сна. Забор крови проводили до сна, через 2,5 часа сна или 0,5 часа после эпизода судорог. Обнаружена тенденция к повышенному уровню в крови S-100B у детей с ЭПЛ до или во время сна по сравнению с показателями при парасомнии без ЭПЛ. Однако выраженное накопление в крови S-100B ($p < 0,05$) наблюдали в обеих пробах только у детей с ЭПЛ, имевших клинические приступы судорог во время сна. Различий уровня NSE у детей с ЭПЛ (с приступами судорог или без) и только парасомнией не было. Рост сывороточного уровня S-100B (но не NSE) у детей с ЭПЛ авторы интерпретируют как усиление секреции S-100B во время судорожного приступа без явного поражения клеток мозга.

В приведенных выше сообщениях китайских авторов [49, 63] у детей с дебютом ЭПЛ одновременно определяли уровни IL-1 β и отдельных НСБ. Shi L. и соавт. [49] установили, что в ЦСЖ детей с идиопатической ЭПЛ значительно повышены уровни всех трех изучаемых биомаркеров (IL-1 β , EPO и NSE), позитивно коррелирующие между собой. Zhu M. и соавт. [63] обнаружили значительно повышенный сывороточный уровень S-100B и GFAP (glial fibrillary acidic protein), наряду с уровнями IL-1 β и HMGB1, через 24 часа после приступа. Однако концентрации IL-1 β и особенно HMGB1 более достоверно предсказывали частоту приступов ЭПЛ в дальнейшем, чем уровень НСБ.

Заключение

Во второй декаде текущего века появились новые сведения, касающиеся этиопатогенеза судорожного синдрома (СС) у детей, в частности роли вирусных инфекций в таких его формах, как ФС, ФЭС, FIRES и ПЭЭПЛ [2, 3, 6, 8, 10, 14, 48, 52]. Сообщают о наличии HHV-6-инфекции в ЦНС у части взрослых пациентов с височной ЭПЛ (MTLE-HS) [16, 59]. Получены доказательства связи между ФЭС и развитием ЭПЛ в дальнейшем [43].

Изучение ответа ЦК у детей с ФС показало разные результаты в зависимости от тяжести судорог (простые ФС или ФЭС) и срока взятия материала относительно припадка [14, 16, 17, 21, 23, 27, 28, 39]. Наряду с подъемом уровня IL-6 и IL-8 в крови, отмечены сниженные концен-

трации ряда ЦК у детей с ФЭС по сравнению с группой контроля, что может быть связано с изначальным нарушением противовирусного иммунного ответа у этой категории пациентов [21, 28]. По результатам исследований авторы рекомендуют использовать в качестве диагностических биомаркеров ФС и ФЭС концентрации в крови IL-6, IL-8 и IL-1RA [21, 32, 39], а в слюне — IL-8 и IL-1 β [11]. Для детей с редким эпилептическим синдромом FIRES характерно накопление в ЦСЖ IL-6, TNF α , IL-8 и ХК для Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) [36, 47].

При неонатальных судорогах отмечены диагностическая значимость подъема в крови уровня IL-8 [62] и прогностическая ценность подъема IL-1, IL-6, TNF α в отношении риска развития ЭПЛ [42]. Сообщают о слабом системном ответе ЦК после простых АФС [23, 32], накоплении в крови IL-1 β и TNF α одновременно с редукцией IL-10 после приступа ЭС [17], а также относительно низком содержании в ЦСЖ ХК для Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) при ЭС (в сравнении с ФЭС) и отсутствии подъема в ЦСЖ всех изученных ЦК/ХК при хронической ЭПЛ [36]. Установлена клиническая информативность сывороточного уровня IL-6 у детей с ЛУЭПЛ [29]. Описан прогностически значимый подъем уровня IL-1 β в крови и ЦСЖ детей с дебютом ЭПЛ [49, 63], тогда как в фазе хронической ЭПЛ в сыворотке крови после приступа нарастают уровни IL-6 и IL-1Ra [9, 51]. В образцах коры головного мозга у детей с ЛУЭПЛ установлена повышенная экспрессия IL-17 и IL-17R [25, 26] и обнаружены CD4⁺ Т-клетки (Th17) и $\gamma\delta$ Т-клетки, продуци-

рующие IL-17 [38, 61]. Особого внимания исследователей патогенеза ЭПЛ заслуживают ХК, контролируемые инфильтрацию мозга иммунными клетками из периферии [19].

Содержание НСБ (S-100B, NSE) в ЦСЖ и крови после приступов ФС длительностью менее 30 минут не нарастает, что, по-видимому, говорит об отсутствии повреждения клеток ЦНС в этих условиях [41, 50], подтверждая предположение о компенсаторном характере подъема ЦК у детей с простыми ФС [27, 32]. Однако более длительные приступы (ЭС) приводят к накоплению S-100B в кровотоке, что прямо коррелирует с признаками поражения мозга на МРТ [22].

Имеются лишь отдельные сообщения о динамике НСБ у детей с ЭПЛ. Показаны рост концентраций S-100B (но не NSE) в сыворотке крови детей с ЭПЛ и парасомнией [30], а также одновременное накопление NSE и IL-1 β в ЦСЖ [49] или S-100B и IL-1 β в крови [63] у детей с дебютом ЭПЛ.

В целом расширение представлений о роли системного и локального воспаления в патогенезе СС [10, 35, 53, 60] делает все более актуальным поиск доступных и специфических биомаркеров воспаления при разных формах СС. Необходимо продолжить изучение роли вирусных (особенно ГВ) инфекций в эпилептогенезе [3, 10, 18, 43, 59], с определением уровней ЦК и НСБ в биосредах детей и взрослых с ПЭЭПЛ. Итогом исследований может стать весомый вклад в разработку новых подходов к предупреждению и лечению ЭС и ЭПЛ у детей [20, 31].

Список литературы/References

1. Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Горелик Е.Ю., Скрипченко Н.В., Жирков А.А. Цитокины и нейроспецифические белки при вирусных энцефалитах и судорожном синдроме у детей. I. Вирусные энцефалиты // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 625–638. [Alexeeva L.A., Zheleznikova G.F., Gorelik E.Y., Skripchenko N.V., Zhirkov A.A. Cytokines and neuron-specific proteins in pediatric viral encephalitis and convulsive syndrome. I. Viral encephalitis. *Infectsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 625–638. (In Russ.)] doi: 10.15789/22207619CAN1448
2. Вашура Л.В., Савенкова М.С., Савенков М.П., Калугина М.Ю., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Самсонович И.Р. Значение вируса герпеса 6-го типа в генезе судорожного синдрома у детей // Детские инфекции. 2014. Т. 13, № 4. С. 18–23. [Vashura L.V., Savenkova M.S., Savenkov M.P., Kalugina M.Y., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Samsonovich I.R. The value of the herpes virus type 6 in the genesis of seizures in children. *Destkie infektsii = Children Infections*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 18–23. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2014-13-4-18-23
3. Горелик Е.Ю., Войтенков В.Б., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Иванова М.В., Клишкин А.В. Острые нейроинфекции и симптоматическая эпилепсия у детей: причинно-следственные связи (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 3. С. 5–13. [Gorelik E.Y., Voitenkov V.B., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Ivanova M.V., Klimkin A.V. Acute neuroinfections and symptomatic epilepsy in children: causal relationship (review). *Zhurnal infekologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 5–13. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-3-5-13
4. Горайнов С.А., Процкий С.В., Охотин В.Е., Павлова Г.В., Ревещин А.В., Потапов А.А. О роли астроглии в головном мозге в норме и патологии // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2013. Т. 7, № 1. С. 45–51. [Goryaynov S.A., Protsky S.V., Okhotin V.E., Pavlova G.V., Revishchin A.V., Potapov A.A. About astroglia in the brain and pathology. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii = Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 45–51. (In Russ.)]
5. Заваденко А.Н., Дегтярева М.Г., Заваденко Н.Н., Медведев М.И. Неонатальные судороги: особенности клинической диагностики // Детская больница. 2013. № 4. С. 41–48. [Zavadenko A.N., Degtyareva M.G., Zavadenko N.N., Medvedev M.I. Neonatal convulsions: clinical diagnostics. *Detskaya bolnica = Children Hospital*, 2013, no. 4, pp. 41–48. (In Russ.)]

6. Мухин К.Ю. Фокальные кортикальные дисплазии: клинико-электро-нейровизуализационные характеристики // Русский журнал детской неврологии. 2016. Т. 11, № 2. С. 8–24. [Mukhin K.Y. Focal cortical dysplasias: clinical and electro-neuroimaging characteristics. *Russkii zhurnal detskoi neurologii* = *Russian Journal of Child Neurology*, 2016, vol. 11, no. 2, pp. 8–24. (In Russ.)] doi: 10.17650/2073-8803-2016-11-2-8-24
7. Симонова Е.В., Харламова Ф.С., Учайкин В.Ф., Дроздова И.М., Семенова Л.П., Анджелъ А.Е. Лимбический энцефалит герпесвирусной этиологии // Детские инфекции. 2014. Т. 13, № 4. С. 6–13. [Simonova E.V., Kharlamova F.S., Uchaikin V.F., Drozdova I.M., Semenova L.P., Andzhel A.E. Limbic encephalitis of herpesvirus etiology. *Destkie infektsii* = *Children Infections*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 6–13. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2014-13-4-6-13
8. Скрипченко Н.В., Кривошеенко Е.М., Команцев В.Н., Горелик Е.Ю., Минченко С.И. Гетерогенность судорожного синдрома при инфекционных заболеваниях у детей. Нейроинфекции у детей. СПб: Тактик-Студио, 2015. С. 691–707. [Skripchenko N.V., Krivosheenko E.M., Komantsev V.N., Gorelik E.Yu., Minchenko S.I. Heterogeneity of convulsive syndrome in infectious diseases in children. In: *Neuroinfection in children*. St. Petersburg: *Taktik-Studio*, 2015, pp. 691–707. (In Russ.)]
9. Alapirtti T., Lehtimäki K., Nieminen R., Mäkinen R., Raitanen J., Moilanen E., Mäkinen J., Peltola J. The production of IL-6 in acute epileptic seizure: a video-EEG study. *J Neuroimmunol.*, 2018, vol. 316, pp. 50–55. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.12.008
10. Bartolini L., Libbey J., Ravizza T., Fujinami R., Jacobson S., Gaillard W. Viral triggers and inflammatory mechanisms in pediatric epilepsy. *Mol. Neurobiol.*, 2019, vol. 56, no. 3, pp. 1897–1907. doi: 10.1007/s12035-018-1215-5
11. Bartolini L., Piras E., Sullivan K., Gillen S., Bumbut A., Lin C., Leibovitch E., Graves J., Waubant E., Chamberlain J., Gaillard W., Jacobson S. Detection of HHV-6 and EBV and cytokine levels in saliva from children with seizures: results of a multi-center cross-sectional study. *Front. Neurol.*, 2018, vol. 9: 834. doi: 10.3389/fneur.2018.00834
12. Bedner P., Dupper A., Hüttmann K., Müller J., Herde M., Dublin P., Deshpande T., Schramm J., Häussler U., Haas C., Henneberger C., Theis M., Steinhäuser C. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain*, 2015, vol. 138, no. 5, pp. 1208–1222. doi: 10.1093/brain/awv067
13. Bhalala U., Koehler R., Kannan S. Neuroinflammation and neuroimmune dysregulation after acute hypoxic-ischemic injury of developing brain. *Front. Pediatr.*, 2015, vol. 2, pp. 144. doi: 10.3389/fped.2014.00144
14. Carballo R., Reyes G., Avaria M., Buompadre M., Gonzalez M., Fortini S., Cersosimo R. Febrile infection-related epilepsy syndrome: a study of 12 patients. *Seizure*, 2013, vol. 22, no. 7, pp. 553–559. doi: 10.1016/j.seizure.2013.04.005
15. Chen Q., Li M., Zhang X., Zhang X., Zhong R., Lin W. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and febrile seizure risk: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2019, vol. 98, no. 39: e17167. doi: 10.1097/MD.00000000000017167
16. Choi J., Choi S., Kim S., Kim H., Lim B., Hwang H., Chae J., Kim K., Oh S., Kim E., Shin J. Association analysis of interleukin-1 β , interleukin-6, and HMGB1 variants with postictal serum cytokine levels in children with febrile seizure and generalized epilepsy with febrile seizure plus. *J. Clin. Neurol.*, 2019, vol. 15, no. 4, pp. 555–563. doi: 10.3988/jcn.2019.15.4.555
17. Choi J., Min H., Shin J. Increased levels of HMGB1 and proinflammatory cytokines in children with febrile seizures. *J. Neuroinflammation*, 2011, vol. 8: 135. doi: 10.1186/1742-2094-8-135
18. Choy M., Dubé C., Ehrenguber M., Baram T. Inflammatory processes, febrile seizures, and subsequent epileptogenesis. *Epilepsy Curr.*, 2014, vol. 14, no 1, pp. 15–22. doi: 10.5698/1535-7511-14.s2.15
19. De Vries E., van den Munckhof B., Braun K., van Royen-Kerkhof A., de Jager W., Jansen F. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2016, vol. 63, pp. 177–190. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.007
20. DeSena A., Do T., Schultert G. Systemic autoinflammation with intractable epilepsy managed with interleukin-1 blockade. *J. Neuroinflammation*, 2018, vol. 15, no. 1: 38. doi: 10.1186/s12974-018-1063-2
21. Gallentine W., Shinnar S., Hesdorffer D., Epstein L., Nordli D., Lewis D., Frank L., Seinfeld S., Shinnar R., Cornett K., Liu B., Moshé S., Sun S. Plasma cytokines associated with febrile status epilepticus in children: a potential biomarker for acute hippocampal injury. *Epilepsia*, 2017, vol. 58, no. 6, pp. 1102–1111. doi: 10.1111/epi.13750
22. Gunawan P., Saharso D., Sari D. Correlation of serum S100B levels with brain magnetic resonance imaging abnormalities in children with status epilepticus. *Korean J. Pediatr.*, 2019, vol. 62, no. 7, pp. 281–285. doi: 10.3345/kjp.2018.07017
23. Ha J., Choi J., Kwon A., Kim K., Kim S., Bae S., Son J., Kim S., Kwak B., Lee R. Interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with febrile seizures. *Seizure*, 2018, vol. 58, pp. 156–162. doi: 10.1016/j.seizure.2018.04.004
24. Haque A., Polcyn R., Matzelle D., Banik N. New insights into the role of neuron-specific enolase in neuro-inflammation, neurodegeneration, and neuroprotection. *Brain Sci.*, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 33. doi: 10.3390/brainsci8020033
25. He J., Li S., Shu H., Yu S., Liu S., Yin Q., Yang H. The interleukin 17 system in cortical lesions in focal cortical dysplasias. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2013, vol. 72, no. 2, pp. 152–163. doi: 10.1097/NEN.0b013e318281262e
26. He J., Wu K., Li S., Shu H., Zhang C., Liu S., Yang M., Yin Q., Yang H. Expression of the interleukin 17 in cortical tubers of the tuberous sclerosis complex. *J. Neuroimmunol.*, 2013, vol. 262, no. 1–2, pp. 85–91. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.05.007
27. Hu M., Huang G., Wu C., Lin J., Hsia S., Wang H., Lin K. Analysis of plasma multiplex cytokines for children with febrile seizures and severe acute encephalitis. *J. Child. Neurol.*, 2014, vol. 29, no. 2, pp. 182–186. doi: 10.1177/0883073813488829
28. Ichiyama T., Suenaga N., Kajimoto M., Tohyama J., Isumi H., Kubota M., Mori M., Furukawa S. Serum and CSF levels of cytokines in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Brain Dev.*, 2008, vol. 30, no. 1, pp. 47–52. doi: 10.1016/j.braindev.2007.05.008
29. Ishikawa N., Kobayashi Y., Fujii Y., Kobayashi M. Increased interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures. *Seizure*, 2015, vol. 25, pp. 136–140. doi: 10.1016/j.seizure.2014.10.007
30. Kaciński M., Budziszewska B., Lasoń W., Zajęc A., Skowronek-Bała B., Leśkiewicz M., Kubik A., Basta-Kaim A. Level of S100B protein, neuron specific enolase, orexin A, adiponectin and insulin-like growth factor in serum of pediatric patients suffering from sleep disorders with or without epilepsy. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, no. 6, pp. 1427–1433. doi: 10.1016/s1734-1140(12)70940-4
31. Kenney-Jung D., Vezzani A., Kahoud R., LaFrance-Corey R., Ho M., Muskardin T., Wirrell E., Howe C., Payne E. Febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra. *Ann. Neurol.*, 2016, vol. 80, no. 6, pp. 939–945. doi: 10.1002/ana.24806

32. Kim K., Kwak B., Kwon A., Ha J., Kim S., Bae S., Son J., Kim S., Lee R. Analysis of plasma multiplex cytokines and increased level of IL-10 and IL-1Ra cytokines in febrile seizures. *J. Neuroinflammation*, 2017, vol. 14, no. 1: 200. doi: 10.1186/s12974-017-0974-7
33. Kimizu T., Takahashi Y., Oboshi T., Horino A., Omatsu H., Koike T., Yoshitomi S., Yamaguchi T., Otani H., Ikeda H., Imai K., Shigematsu H., Inoue Y. Chronic dysfunction of blood-brain barrier in patients with post-encephalitic/encephalopathic epilepsy. *Seizure*, 2018, vol. 63, pp. 85–90. doi: 10.1016/j.seizure.2018.11.005
34. Kobylarek D., Iwanowski P., Lewandowska Z., Limphaibool N., Szafranek S., Labrzycka A., Kozubski W. Advances in the potential biomarkers of epilepsy. *Front. Neurol.*, 2019, vol. 10: 685. doi: 10.3389/fneur.2019.00685
35. Koh S. Role of neuroinflammation in evolution of childhood epilepsy. *J. Child. Neurol.*, 2018, vol. 33, no. 1, pp. 64–72. doi: 10.1177/0883073817739528
36. Kothur K., Bhandokar S., Wienholt L., Chu S., Pope A., Gill D., Dale R. Etiology is the key determinant of neuroinflammation in epilepsy: elevation of cerebrospinal fluid cytokines and chemokines in febrile infection-related epilepsy syndrome and febrile status epilepticus. *Epilepsia*, 2019, vol. 60, no. 8, pp. 1678–1688. doi: 10.1111/epi.16275
37. Kramer U., Chi C., Lin K., Specchio N., Sahin M., Olson H., Nababout R., Kluger G., Lin J., van Baalen A. Febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): pathogenesis, treatment, and outcome: a multicenter study on 77 children. *Epilepsia*, 2011, vol. 52, no. 11, pp. 1956–1965. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03250.x
38. Kumar P., Chan D., Lim A., Paleja B., Ling S., Yun L., Poh S., Ngho A., Arkachaisri T., Yeo J., Albani S. Pro-inflammatory, IL-17 pathways dominate the architecture of the immunome in pediatric refractory epilepsy. *JCI Insight*, 2019, vol. 4, no. 8: e126337. doi: 10.1172/jci.insight.126337
39. Kwon A., Kwak B., Kim K., Ha J., Kim S., Bae S., Son J., Kim S., Lee R. Cytokine levels in febrile seizure patients: a systematic review and meta-analysis. *Seizure*, 2018, vol. 59, pp. 5–10. doi: 10.1016/j.seizure.2018.04.023
40. Mao L., Ding J., Peng W., Ma Y., Zhang Y., Fan W., Wang X. Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. *Epilepsia*, 2013, vol. 54, no. 9: e142-5. doi: 10.1111/epi.12337
41. Mikkonen K., Pekkala N., Pokka T., Romner B., Uhari M., Rantala H. S100B proteins in febrile seizures. *Seizure*, 2012, vol. 21, no. 2, pp. 144–146. doi: 10.1016/j.seizure.2011.10.006
42. Numis A., Foster-Barber A., Deng X., Rogers E., Barkovich A., Ferriero D., Glass H. Early changes in pro-inflammatory cytokine levels in neonates with encephalopathy are associated with remote epilepsy. *Pediatr. Res.*, 2019, vol. 86, no. 5, pp. 616–621. doi: 10.1038/s41390-019-0473-x
43. Patterson K., Baram T., Shinnar S. Origins of temporal lobe epilepsy: febrile seizures and febrile status epilepticus. *Neurotherapeutics*, 2014, vol. 11, no. 2, pp. 242–250. doi: 10.1007/s13311-014-0263-4
44. Pillai S., Mohammad S., Hacohen Y., Tantsis E., Prelog K., Barnes E., Gill D., Lim M., Brilot F., Vincent A., Dale R. Postencephalitic epilepsy and drug-resistant epilepsy after infectious and antibody-associated encephalitis in childhood: clinical and etiologic risk factors. *Epilepsia*, 2016, vol. 57, no. 1, pp. e7–e11. doi: 10.1111/epi.13253
45. Pisani F., Piccolo B., Cantalupo G., Copioli C., Fusco C., Pelosi A., Tassinari C., Seri S. Neonatal seizures and postneonatal epilepsy: a 7-y follow-up study. *Pediatr. Res.*, 2012, vol. 72, no. 2, pp. 186–193. doi: 10.1038/pr.2012.66
46. Saghazadeh A., Mastrangelo M., Rezaei N. Genetic background of febrile seizures. *Rev. Neurosci.*, 2014, vol. 25, no. 1, pp. 129–161. doi: 10.1515/revneuro-2013-0053
47. Sakuma H., Tanuma N., Kuki I., Takahashi Y., Shiomi M., Hayashi M. Intrathecal overproduction of proinflammatory cytokines and chemokines in febrile infection-related refractory status epilepticus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2015, vol. 86, no. 7, pp. 820–822. doi: 10.1136/jnnp-2014-309388
48. Serino D., Santarone M., Caputo D., Fusco L. Febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): prevalence, impact and management strategies. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2019, vol. 15, pp. 1897–1903. doi: 10.2147/NDT.S177803
49. Shi L., Chen R., Zhang H., Jiang C., Gong J. Cerebrospinal fluid neuron specific enolase, interleukin-1 β and erythropoietin concentrations in children after seizures. *Child's Nerv. Syst.*, 2017, vol. 33, no. 5, pp. 805–811. doi: 10.1007/s00381-017-3359-4
50. Shiihara T., Miyake T., Izumi S., Sugihara S., Watanabe M., Takanashi J., Kubota M., Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev.*, 2014, vol. 36, no. 6, pp. 489–495. doi: 10.1016/j.braindev.2013.06.011
51. Uludag I., Bilgin S., Zorlu Y., Tuna G., Kirkali G. Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures. *Seizure*, 2013, vol. 22, no. 6, pp. 457–461. doi: 10.1016/j.seizure.2013.03.004
52. Van Baalen A., Vezzani A., Häusler M., Kluger G. Febrile infection-related epilepsy syndrome: clinical review and hypotheses of epileptogenesis. *Neuropediatrics*, 2017, vol. 48, no. 1, pp. 5–18. doi: 10.1055/s-0036-1597271
53. Vargas-Sánchez K., Mogilevskaya M., Rodríguez-Pérez J., Rubiano M., Javela J., González-Reyes R. Astroglial role in the pathophysiology of status epilepticus: an overview. *Oncotarget*, 2018, vol. 9, no. 42, pp. 26954–26976. doi: 10.18632/oncotarget.25485
54. Vezzani A., Aronica E., Mazarati A., Pittman Q. Epilepsy and brain inflammation. *Exp. Neurol.*, 2013, vol. 244, pp. 11–21. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.09.033
55. Vezzani A., Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, 2015, vol. 96, pp. 70–82. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.027
56. Vitaliti G., Pavone P., Marino S., Saporito M., Corsello G., Falsaperla R. Molecular mechanism involved in the pathogenesis of early-onset epileptic encephalopathy. *Front. Mol. Neurosci.*, 2019, vol. 12, pp. 118. doi: 10.3389/fnmol.2019.00118
57. Walker L., Janigro D., Heinemann U., Riikonen R., Bernard C., Patel M. WONOEP appraisal: molecular and cellular biomarkers for epilepsy. *Epilepsia*, 2016, vol. 57, no. 9, pp. 1354–1362. doi: 10.1111/epi.13460
58. Wilcox K., Vezzani A. Does brain inflammation mediate pathological outcomes in epilepsy? *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014, vol. 813, pp. 169–183. doi: 10.1007/978-94-017-8914-1_14
59. Wipfler P., Dunn N., Beiki O., Trinka E., Fogdell-Hahn A. The viral hypothesis of mesial temporal lobe epilepsy — is human herpes virus-6 the missing link? A systematic review and meta-analysis. *Seizure*, 2018, vol. 54, pp. 33–40. doi: 10.1016/j.seizure.2017.11.015
60. Xanthos D., Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 43–53. doi: 10.1038/nrn3617

61. Xu D., Robinson A., Ishii T., Duncan D., Alden T., Goings G., Ifergan I., Podojil J., Penaloza-MacMaster P., Kearney J., Swanson G., Miller S., Koh S. Peripherally derived T regulatory and $\gamma\delta$ T cells have opposing roles in the pathogenesis of intractable pediatric epilepsy. *J. Exp. Med.*, 2018, vol. 215, no. 4, pp. 1169–1186. doi: 10.1084/jem.20171285
62. Youn Y., Kim S., Sung I., Chung S., Kim Y., Lee I. Serial examination of serum IL-8, IL-10 and IL-1Ra levels is significant in neonatal seizures induced by hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Scand. J. Immunol.*, 2012, vol. 76, no. 3, pp. 286–293. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02710.x
63. Zhu M., Chen J., Guo H., Ding L., Zhang Y., Xu Y. High mobility group protein B1 (HMGB1) and interleukin-1 β as prognostic biomarkers of epilepsy in children. *J. Child Neurol.*, 2018, vol. 33, no. 14, pp. 909–917. doi: 10.1177/0883073818801654

Авторы:

Алексеева Л.А., д.б.н., руководитель и ведущий научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики Детского научно-клинического центра инфекционных болезней (ДНК ЦИБ) ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Железникова Г.Ф., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Горелик Е.Ю., к.м.н., научный сотрудник отдела нейроинфекций и органической патологии нервной системы ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Скрипченко Н.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зам. директора по научной работе ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой инфекционных болезней ФП и ДПО Государственного педиатрического медицинского университета Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;
Жирков А.А., младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Alekseeva L.A., PhD, MD (Biology), Head and Leading Researcher of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency (PRCCID), St. Petersburg, Russian Federation;
Zheleznikova G.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;
Gorelik E.Y., PhD (Medicine), Researcher, Department of Neuroinfection and Organic Pathology of the Nervous System, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;
Skripchenko N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of Science, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Infectious Diseases of Postgraduate and Continuing Professional Education, St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;
Zhirkov A.A., Junior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.04.2020
 Отправлена на доработку 04.06.2020
 Принята к печати 13.07.2020

Received 08.04.2020
 Revision received 04.06.2020
 Accepted 13.07.2020

SAFETY OF DENGUE VACCINE (CYD-TDV) IN ASIA: A SYSTEMATIC REVIEW

W.R. Wan Ismail^a, M.Sh. Abdul Majid^a, H.Y. Li^a, M.F. Madrim^b, S.Sh.S. Abdul Rahim^b,
M.S. Jeffree^b, Z.I. Azhar^c, H.F. Ghazi^d, M.R. Hassan^a

^a National University of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia

^b Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Malaysia

^c Universiti Teknologi MARA, Shah Alam, Malaysia

^d College of Nursing, Al-Bayan University, Baghdad, Iraq

Abstract. The use of the vaccine in Asia is still very much limited and remained controversial due to its safety, which has yet been properly assessed and evaluated. Hence, the objective of this review is to assess the safety of the CYD-TDV dengue vaccine of the efficacy trials conducted in Asia. A total of 309 related articles were generated from the electronic database search using relevant keywords and only four of the articles were selected for the final review process. The seroprevalence at baseline of the participants involved in the studies was between 50 percent and 80 percent. In terms of the safety of the CYD-TDV vaccine, injection site reaction (pain, swelling, erythema) recorded a relative risk (RR) at 95% CI of (0.46–1.76) and systemic reactions (fever, headache, myalgia) also with RR at 95% CI of (0.89–1.81) were detected among the participants. Among the four studies reviewed, three studies reported some severe adverse effect experienced by the participants with RR at 95% CI of (0.92–2.11). In terms of the immunogenicity, high GMT values were reported for DENV-2 at 67.8 (95%CI of 64.8–70.8), DENV-3 at 73.1 (95% CI of 69.9–76.3) and DENV-4 at 65 (95%CI of 62–67.9) where even though lower values were reported it is consistent with other published studies on the immunogenicity of the CYD-TDV against the DENV serotypes. This review showed that the CYD-TDV can be considered for use in Asia, but with several conditions and following current safety recommendations.

Key words: Dengue vaccine, CYD-TDV, safety, adults, children, Asia.

БЕЗОПАСНОСТЬ ВАКЦИНЫ ОТ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ (CYD-TDV) В АЗИИ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Ван Исмаил В.Р.¹, Абдул Маджид М.Ш.¹, Ли Х.Ю.¹, Мадрим М.Ф.², Абдул Рахим С.Ш.С.²,
Джеффри М.С.², Азар З.И.³, Гази Х.Ф.⁴, Хасан М.Р.¹

¹ Национальный университет Малайзии, Куала-Лумпур, Малайзия

² Малайзиский университет штата Сабах, Кота-Кинабалу, Малайзия

³ Технологический университет MARA, Шах-Алам, Малайзия

⁴ Колледж по подготовке среднего медицинского персонала, Университет Аль-Баян, Багдад, Ирак

Резюме. Применение вакцины от лихорадки денге (CYD-TDV) в Азии в настоящее время остается достаточно ограниченным и противоречивым из-за вопросов безопасности, пока остающихся не оцененными должным образом. В связи с этим, целью нашего обзора стало проведение оценки безопасности вакцины CYD-TDV на основе анализа данных по эффективности ее применения в Азии. Поиск релевантных ключевых

Адрес для переписки:

Моход Рохайзат Хассан
56000, Малайзия, Черас, Куала-Лумпур, Бандар Тун Разак,
Джалан Яакоб Латиф, Национальный университет Малайзии.
E-mail: rohaizat@ppukm.ukm.edu.my

Contacts:

Mohd Rohaizat Hassan
Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur,
Malaysia, National University of Malaysia.
E-mail: rohaizat@ppukm.ukm.edu.my

Для цитирования:

Ван Исмаил В.Р., Абдул Маджид М.Ш., Ли Х.Ю., Мадрим М.Ф.,
Абдул Рахим С.Ш.С., Джеффри М.С., Азар З.И., Гази Х.Ф., Хасан М.Р.
Безопасность вакцины от лихорадки денге (CYD-TDV) в Азии:
систематический обзор // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3.
С. 447–453. doi: 10.15789/2220-7619-SOD-1297

Citation:

Wan Ismail W.R., Abdul Majid M.Sh., Li H.Y., Madrim M.F., Abdul Rahim S.Sh.S.,
Jeffree M.S., Azhar Z.I., Ghazi H.F., Hassan M.R. Safety of dengue vaccine
(CYD-TDV) in Asia: a systematic review // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 447–453.
doi: 10.15789/2220-7619-SOD-1297

слов в электронных базах данных обнаружил 309 научных статей, из которых в обзор вошли лишь четыре публикации. Исходная распространенность серотипов среди участников исследований составляла 50–80%. В отношении безопасности вакцины CYD-TDV показано, что реакция в месте введения (боль, отек, эритема) отмечена с относительным риском (RR) 95% ДИ (0,46–1,76), как и системные реакции (лихорадка, головная боль, миалгия) [95% ДИ (0,89–1,81)]. Из четырех работ, включенных в обзор, три содержат данные о ряде тяжелых неблагоприятных эффектов при RR 95% ДИ (0,92–2,11). В отношении иммуногенности показано, что для DENV-2 отмечено высокое среднее геометрическое значение титра в 67,8 (95% ДИ 64,8–70,8), DENV-3 — в 73,1 (95% ДИ 69,9–76,3), а для DENV-4 — в 65 (95% ДИ 62–67,9), когда при обнаружении даже меньших величин это согласуется с другими опубликованными работами по иммуногенности вакцины CYD-TDV в отношении серотипов DENV. В нашем обзоре показано, что вакцина CYD-TDV может рассматриваться для применения в Азии, но с учетом ряда условий и выполнения настоящих рекомендаций по безопасности.

Ключевые слова: вакцина от лихорадки Денге, CYD-TDV, безопасность, взрослые, дети, Азия.

Introduction

Dengue is an arthropod-borne viral disease caused by four distinct virus serotypes, namely DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. It belongs to the family *Flaviviridae*, which is made up of positive-sense single-stranded RNA viruses. Dengue fever is caused by infection with one of four serotypes of the dengue flavivirus (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4) that usually manifests subclinically or with symptoms such as fever, headache, arthralgia, myalgia, retro-orbital pain, rash, bleeding, thrombocytopenia or leucopenia [5]. Dengue fever is endemic in more than 125 countries and it affects more than 100 million people and with 25,000 deaths reported annually worldwide. The virus is transmitted to a human host by the bite of an infected mosquito, namely *Aedes mosquito* of the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, which is the disease vector. Its ubiquitous transmission especially in the tropical countries contributed to the high incidence of reported cases in Asia and the Americas [2]. Treatment for dengue is mainly supportive and preventive measure such as environmental management, spraying insecticides and personal protective measures as there is no specific treatment available as well as no effective antivirals available [12]. There are several vaccines in the pipeline but CYD-TDV vaccine was recently licensed to be used in large population.

CYD-TDV is a recombinant, live, attenuated, tetravalent dengue vaccine and was licensed on the basis of three efficacy trials in the Asia Pacific region and Latin America [4]. WHO issued its stand on the use of the vaccine in July 2016 referring to the recommendations provided by SAGE in April 2016. According to them, the countries that are interested in introducing the vaccine should consider its use only in those of aged 9 years and above, and in areas with a seroprevalence of $\geq 70\%$, and not in areas below 50%. Besides that, SAGE also mentioned regarding evidence of the absence of a safety issue in seronegative individuals aged 9 and above was based on the limited data set of 10–20% of the trial population, and highlighted the urgent need to bet-

ter describe the long-term benefit-risk ratio of CYD-TDV in seronegative individuals. On 29 November 2017, CYD-TDV manufacturer announced the results of additional studies to better describe the benefit-risk in seronegative individuals. This was made possible through the use of a newly developed NS1-based antibody assay applied to blood samples taken 13 months after vaccination to retrospectively infer dengue serostatus at the time of the first vaccination [19]. The objective of this review is to assess the safety of the CYD-TDV dengue vaccine of the efficacy trials conducted in Asia.

Materials and methods

Cochrane Library, Scopus, PubMed and Google Scholar were searched from 2012 through 2017 with language restricted to English. The search strategies, based on a combination of relevant Title/Abstract, text words and word variants for dengue vaccine, safety, adult, children and Asia. Research strategy followed the PICO strategy. Key search terms included Population: dengue fever, dengue hemorrhagic fever, severe dengue, adult, children and Asia; Intervention: dengue vaccine, CYD-TVD and Dengvaxia; Comparator: placebo and control group; and Outcome: safety, long term safety, dengue incidence and adverse effect. Eligibility criteria for studies to be included in the meta-analysis were as follows: (1) randomized controlled trial (RCT), (2) study on the safety of vaccines using the CYD-TDV (3) performed on children or adult and (4) reporting the safety of both the vaccine group and a control group (5) study with seroprevalence at the baseline (as recommended by SAGE) (6) original article, (7) English language, (8) study duration from 1.1.2012 till 31.12.2017. We excluded studies that did not assess CYD-TDV vaccine safety or did not use CYD-TDV vaccine and studies that used other than RCT. The search was done on 16 April 2018.

Two reviewers independently screened the titles and abstracts using the eligibility criteria. Any discrepancies were resolved by a third reviewer, where necessary. Two independent reviewers used a standardized data extraction form to collect all relevant data from the studies. The following data were extracted: study

ID, year, country of study, design of study, study period, participants (vaccine group and control group), age range, safety profile (cases/number of participants for pain, erythema, swelling, fever, headache, myalgia and severe adverse effect), and immunogenicity (GMTs). For CYD-TDV safety, the relative risk (RR) was measured and the immunogenicity is measured as Geometric Mean Titer (GMTs) was estimated using the Weighted Mean Difference (WMD). Relative risk was defined as the ratio of incidence in the CYD-TDV vaccine group divided by the ratio of incidence in the unvaccinated group. Mean Difference was defined as an absolute difference between the GMTs in the intervention and control groups.

Analyses were performed using Review Manager [14]. The forest plot was used to determine the possibility of combining data from studies in a meta-analysis. The I² and chi squared were used to formally check for the presence of heterogeneity. Heterogeneity was classified as low, medium and high for I² values corresponding to 25, 50, and 75%, respectively and chi squared testing with p < 0.01 denoting level of significance. The fixed effects model was preferred as we hypothesized that there is one true effect size which underlies all the studies in the analysis.

Results

Search results. The initial electronic search identified 117 abstracts from Cochrane Library, 104 from Scopus, 16 from PubMed and 72 from Google Scholar, added up to form 309 of total articles. 184 articles were removed for irrelevance of the titles. 125 potential relevant abstracts were then screened for eligibility and 68 abstracts were removed for not

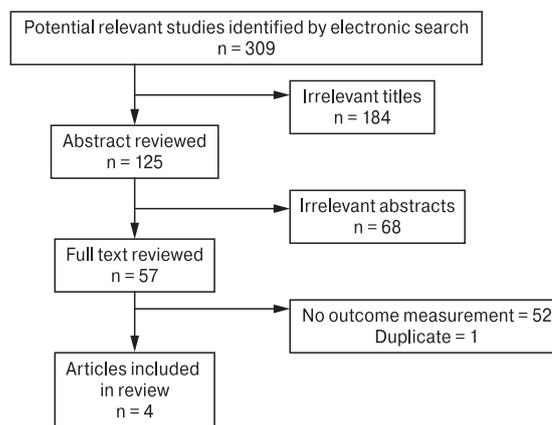


Figure 1. Process of study selection

fulfilling the eligibility criteria. 57 full texts were extracted and reviewed but 53 were excluded for not explicitly displaying the outcome measurement and duplication. Four publications met our inclusion criteria and were included in the final analysis (Fig. 1).

Characteristics of the included studies are presented in Table 1. One study which is conducted in Malaysia is in phase III and other studies are in phase II. The number of participants in each included study varied from 90 to 1,198. Range of the participants' age varied between the studies with age range from 12 months to 45 years. Only children are participants in study conducted in Philippines with longest study duration which is to 24 months. The baseline seroprevalence of vaccine varies for dengue vaccine group (52 to 76%) and placebo group (50 to 60%).

Vaccine safety. Generally, severe adverse effect and systemic reaction showed an increased, but statistically insignificant risk in vaccinated participants compared

Table 1. Study characteristic

References	Country	Study design	Study duration	Sample size		Age range	Seroprevalence at baseline	
				CYD-TDV	Placebo		CYD-TDV	Placebo
Crevat et al. (2015) [6]	Philippines	RCT (II)	24 months	60	30	12 to 15 months	52%	50%
Hss et al. (2013) [9]	Malaysia	RCT (III)	18 months	199	51	2 to 2 years	55.8%	60.8%
Leo et al. (2012) [10]	Singapore	RCT (II)	6 months	898	300	2 to 45 years	71%	67%
Tran et al. (2012) [17]	Vietnam	RCT (II)	6 months	120	60	2 to 45 years	76%	80%

Table 2. Main CYD-TDV findings

Safety Profile	No. of studies combined	Intervention (n/N)	Control (n/N)	Heterogeneity (p-value)	RR (95% CI)	p-value
Severe adverse effect	3	105/1076	26/390	15.0% (0.310)	1.39 (0.92; 2.11)	0.12
Injection site						
Pain (any)	4	665/1275	281/441	92.0% (< 0.0001)	0.79 (0.72; 0.86)	< 0.0001
Erythema (any)	4	169/1275	90/441	79.0% (0.002)	0.58 (0.46; 0.73)	< 0.0001
Swelling (any)	4	235/1275	60/441	92.0% (< 0.0001)	1.41 (1.13; 1.76)	0.003
Systemic reaction						
Fever (any)	4	193/1275	49/441	0.0% (0.570)	1.36 (1.01; 1.81)	0.04
Headache (any)	3	550/1215	153/411	0.0% (0.820)	1.20 (1.04; 1.38)	0.01
Myalgia (any)	3	496/1215	161/411	0.0% (0.650)	1.02 (0.89; 1.17)	0.75

Note. N, sample size; n, number of cases recorded; RR, relative risk.

with unvaccinated participants. Vaccinated participants have higher risk to develop swelling while reduced risk for pain and erythema. (Fig. 2 & Table 2).

Vaccine immunogenicity. Three studies were included for immunogenicity. Table 3 showed dengue serotype-specific antibody response before first dose

and after third dose of CYD-TDV or control vaccine for the included studies.

The combined serotype-specific GMT levels found after resolving heterogeneity in descending order was: Serotype 3 (73.1 1/dil), Serotype 2 (67.8 1/dil), Serotype 4 (65 1/dil), and Serotype 1 (52.5 1/dil) (Table 4).

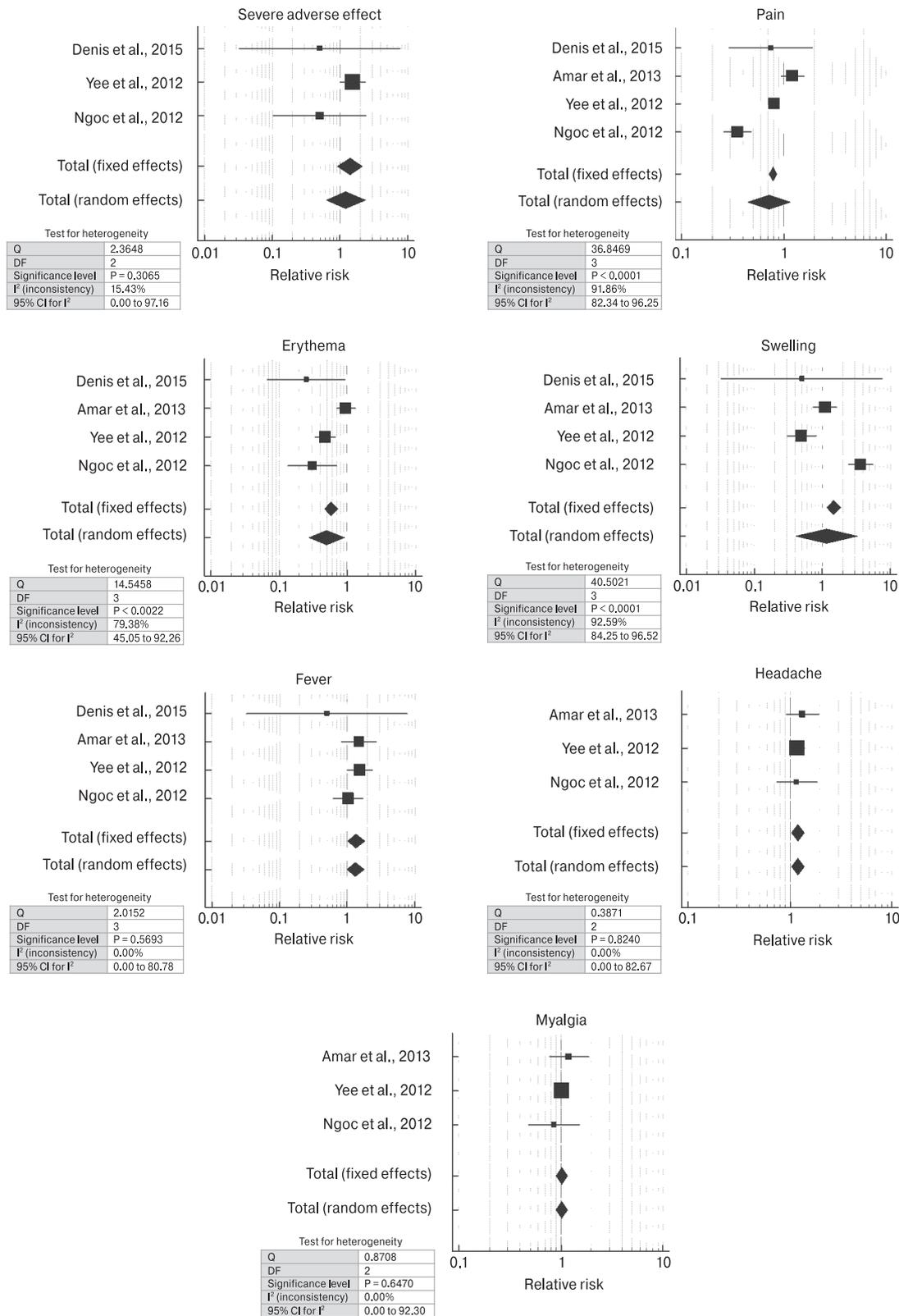


Figure 2. Forest plots of the meta-analysis of severe adverse effect, systemic and injection site reaction

Table 3. Comparison of dengue serotype-specific antibody response at baseline and after 3rd dose

Hss et al. (2013) [9]								
	Dengue group, N = 196				Control group, N = 50			
	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
Baseline	15.3 (11.5; 20.4)	15.9 (11.8; 21.3)	15.6 (12.3; 19.9)	9.92 (8.17; 12.0)	18.6 (9.69; 35.8)	18.6 (10.0; 34.5)	15.9 (9.57; 26.5)	12.3 (7.96; 19.0)
After 3rd dose	151 (121; 188)	180 (146; 221)	193 (161; 231)	114 (97.0; 134)	18.9 (9.94; 35.8)	16.3 (9.59; 27.7)	16.3 (9.81; 27.0)	10.9 (7.34; 16.2)
Leo et al. (2012) [10]								
	Dengue group, N = 438				Control group, N = 147			
	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
Baseline	8.13 (7.16; 9.24)	8.97 (7.80; 10.3)	8.48 (7.58; 9.50)	9.22 (7.33; 11.6)	8.34 (6.71; 10.4)	8.49 (6.73; 10.7)	9.22 (7.33; 11.6)	6.84 (5.88; 7.95)
After 3rd dose	43 (36.4; 50.8)	69.7 (59.6; 81.7)	96 (84.3; 109)	100 (88.7; 113)	8.51 (6.93; 10.4)	8.17 (6.60; 10.1)	8.89 (7.17; 11.0)	7.75 (6.55; 9.17)
Tran NH et al. (2012) [17]								
	Dengue group, N = 120				Control group, N = 60			
	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
Baseline	32.8 (21.7; 49.5)	33.7 (23.0; 49.6)	32.5 (23.7; 44.5)	17.1 (12.9; 22.6)	19.6 (12.0; 31.8)	27.2 (15.3; 48.1)	20.5 (13.2; 31.9)	13.9 (9.28; 20.9)
After 3rd dose	129 (0.5; 183)	216 (163; 286)	169 (134; 214)	146 (115; 184)	25.3 (13.7; 46.8)	30.4 (16.7; 55.1)	25.2 (16.3; 39.1)	17.4 (11.2; 27.0)

Table 4. Main CYD-TDV Immunogenicity findings

Serotype	Number of studies combined	Heterogeneity (p-value)	WMD expressed as GMTs (95% CI)	p-value
DENV1	3	88.23% (0.0002)	52.5 (50.2–54.8)	< 0.0001
DENV2	3	0.00% (0.8797)	67.8 (64.8–70.8)	< 0.001
DENV3	3	88.7% (0.0001)	73.1 (69.9–76.3)	< 0.001
DENV4	3	97.92% (< 0.0001)	65.0 (62.0–67.9)	< 0.001

Discussion

Vaccine safety. The findings on vaccine safety is quite different when compared to other study in Malisheni et al. (2017). This might be due to the different of sample population taken in the study where the children age range is from 1 up to 17 years old and the baseline seroprevalence in that study is 37 to 91% for vaccination group and 48–91% for placebo group. The main concern in the vaccine safety is the severe adverse effects [1]. The relative risk is more than one but significant when compared to the other study. Due to high baseline seroprevalence in this study which range from 50 up to 80%, the number of severe adverse effects is expected to be high due to induced cross reaction with existing antibody. This might be due to small sample size taken in this review which is much lower compared to other study with nearly 40 thousand samples pooled for the review.

The injection of vaccine is supposed to cause pain due to the introduction of foreign substance which induces pain and also erythema. However, these findings show that the vaccination group does not cause pain and erythema as much as the placebo group. This might be due to the fact that the placebo group was given with many other different types of vaccine such as Hepatitis-A, Typhoid, Varicella and Inactivated-

influenza vaccine which may have different reaction based on type of vaccine, dosage, repeated exposure, preservative used in the vaccine and many more [3]. The later health effects that tend to develop after period of time are swelling and fever. In this study, again has relative risk more than one and significant which might be due to several reasons. The first one is that the swelling and fever develop higher in vaccination group compared to the placebo group which might be due to the high seroprevalence of dengue in baseline. This high seroprevalence in the baseline of this study may induce cross reaction when vaccine due to some homologous structure that may enhance the inflammatory reaction. The second reason is that the placebo group is vaccine-naïve [7]. The vaccine injected in placebo group is relatively used to protect from getting severe fulminant disease or complication which most of the samples are not exposed to.

Vaccine immunogenicity. Our finding on immunogenicity of the vaccine are similar compared to Malisheni et al. 2017 [11]. The Geometric Mean Titres (GMTs) were higher among vaccinated study participants compared to unvaccinated study participants. Comparatively, study participants from Malaysia had higher GMT levels compared to those from Singapore and Vietnam. In contrast to the findings, we found that studies involving older participants

had lower GMT compared to others. This could be due to the smaller number of participants. Apart from mentioned findings, we also found that antibody response was higher during subsequent infection among those who had prior dengue virus exposure compared to others [11]. The observed GMTs were varied and the variation was most likely caused by the unequal burden of dengue infection across the countries. The other possible cause is the procedure of quantifying the neutralizing antibody titre of the infection. Even though Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) is considered as the gold standard, there are studies debating not only on discrepancies between laboratories and regions [15, 18], but also on inaccuracy of the test which depends on test conditions applied [13, 16]. The vaccine induces neutralizing antibodies against all four serotypes, but the outcome would differ according to seropositivity or seronegativity of vaccinees. Among seronegative vaccinees, responses to complete vaccine regimen are commonly homogenous, especially for Dengue Virus serotype four, whereby for the other serotypes, the responses are depending on the cross-reactive antibodies [8].

SAGE recommendation. In regards to the choice on a «pre-vaccination screening» strategy will indeed need an assessment at the country level including validity of available tests, local issues, dengue epidemiology, hospitalization rates as well as adequate finances for both CYD-TDV and screening tests. In terms of age, the vaccine should be used within the indicated age range, which is typically from 9

to 45 years. With recommendation as a three dose series given 6 months apart. However, there are currently no data on the use of booster doses. Some areas recommended to focus in the future would be development of a highly sensitive and specific rapid diagnostic test to determine serostatus, and assessment of simplified immunization schedules and booster needs should be prioritized [19].

Conclusion

Risk of some safety parameter noted to be increased with the administration of the vaccine, but the finding was not significant and a longer period of follow up focusing on the complications is required in order to generate better conclusion. Age group stratification is needed as other studies performed previously showed that immunogenicity of the vaccine among children was better compared to adolescents. Due to the burden of disease, especially in the area with high endemicity and no available treatment, the vaccine should be considered. CYD-TDV can be considered to use in Asia but with several conditions and following current safety recommendations.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the Director General Ministry of Health Malaysia and University Kebangsaan Malaysia for allowing publication of this review.

References

1. Aguiar M., Stollenwerk N., Halstead S.B. The Impact of the newly licensed dengue vaccine in endemic countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 10, no. 12: e0005179. doi: 10.1371/journal.pntd.0005179
2. Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L., Drake J.M., Brownstein J.S., Hoen A.G., Sankoh O., Myers M.F., George D.B., Jaenisch T., Wint G.R., Simmons C.P., Scott T.W., Farrar J.J., Hay S.I. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 2013, vol. 496, no. 7446, pp. 504–507. doi: 10.1038/nature12060
3. Capeding M.R., Laot T.M., Boaz M., Wartel T.A., Crevat D. Immunogenicity and safety of a tetravalent dengue vaccine during a five-year follow-up period. *Trials Vaccinol.*, 2015, vol. 4, pp. 19–23. doi: 10.1016/j.trivac.2015.03.002
4. Capeding M.R., Tran N.H., Hadinegoro S.R., Ismail H.I., Chotpitayasunondh T., Chua M.N., Luong C.Q., Rusmil K., Wirawan D.N., Nallusamy R., Pitisuttithum P., Thisyakorn U., Yoon I.K., van der Vliet D., Langevin E., Laot T., Hutagalung Y., Frago C., Boaz M., Wartel T.A., Tornieporth N.G., Saville M., Bouckennooghe A.; CYD14 Study Group. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2014, vol. 384, no. 9951, pp. 1358–1365. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61060-6
5. Coudeville L., Baurin N., Vergu E. Estimation of parameters related to vaccine efficacy and dengue transmission from two large phase III studies. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 50, pp. 6417–6425. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.11.023
6. Crevat D., Brion J.D., Gailhardou S., Laot T.M., Capeding M.R. First experience of concomitant vaccination against dengue and MMR in toddlers. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2015, vol. 34, no. 8, pp. 884–892. doi: 10.1097/INF.0000000000000752
7. Da Costa V.G., Marques-Silva A.C., Floriano V.G., Moreli M.L. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine: a meta-analysis of randomized trials. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 39, pp. 4885–4892. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.008
8. Guy B., Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 14, pp. 45–54. doi: 10.1038/nrmicro.2015.2
9. Hss A.S., Koh M.T., Tan K.K., Chan L.G., Zhou L., Bouckennooghe A., Crevat D., Hutagalung Y. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2–11 years in Malaysia: a randomized, placebo-controlled, Phase III study. *Vaccine*, 2013, vol. 31, no. 49, pp. 5814–5821. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.013
10. Leo Y.S., Wilder-Smith A., Archuleta S., Shek L.P., Chong C-Y, Leong H.N., Low C.Y., Oh M.-L.H., Bouckennooghe A., Wartel T.A., Crevat D. Immunogenicity and safety of recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in individuals aged 2–45 y: Phase II randomized controlled trial in Singapore. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, vol. 8, no. 9, pp. 1259–1271. doi: 10.4161/hv.21224

11. Malisheni M., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A., Takah N., Murewanhema G., Bates M. Clinical efficacy, safety, and immunogenicity of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in children: a systematic review with meta-analysis. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 863. doi: 10.3389/fimmu.2017.00863
12. Mustafa M.S., Rasotgi V., Jain S., Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control. *Med. J. Armed Forces India*, 2015, vol. 71, no. 1, pp. 67–70. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011
13. Rainwater-Lovett K., Rodriguez-Barraquer I., Cummings D.A.T., Lessler J. Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis. *BMC Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 1: 233. doi: 10.1186/1471-2334-12-233
14. ReviewManager (RevMan). Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014. URL: <https://training.cochrane.org/online-learning/core-software-cochrane-reviews/revman>
15. Tang K.F., Ooi E.E. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2012, vol. 10, no. 8, pp. 895–907. doi: 10.1586/eri.12.76
16. Thomas S.J., Nisalak A., Anderson K.B., Libraty D.H., Kalayanarooj S., Vaughn D.W., Putnak R., Gibbons R.V., Jarman R., Endy T.P. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: how alterations in assay conditions impact performance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009, vol. 81, no. 5, pp. 825–833. doi: 10.4269/ajtmh.2009.08-0625
17. Tran N.H., Luong C.Q., Vu T.Q.H., Forrat R., Lang J., Vu Q.D., Bouckennooghe A., Wartel T.A. Safety and immunogenicity of recombinant, live attenuated tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in healthy vietnamese adults and children. *J. Vaccines Vaccin.*, 2012, vol. 3, iss. 7: 1000162. doi: 10.4172/2157-7560.1000162
18. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: WHO, 2009. 147 p.
19. WHO. Revised SAGE recommendation on use of dengue vaccine. Geneva: WHO, 2018. URL: http://www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised_SAGE_recommendations_dengue_vaccines_apr2018/en

Авторы:

Ван Исмаил В.Р., доктор санитарии и общественной гигиены, кафедра здравоохранения, Национальный университет Малайзии, Куала-Лумпур, Малайзия;

Абдул Маджид М.Ш., доктор санитарии и общественной гигиены, кафедра здравоохранения, Национальный университет Малайзии, Куала-Лумпур, Малайзия;

Ли Х.Ю., магистр социального здравоохранения, кафедра здравоохранения, Национальный университет Малайзии, Куала-Лумпур, Малайзия;

Мадрим М.Ф., доктор санитарии и общественной гигиены, преподаватель кафедры общественной и семейной медицины, факультет медицины и медико-санитарных дисциплин, Малайзийский университет штата Сабах, Кота-Кинабалу, Малайзия;

Абдул Рахим С.Ш.С., доктор санитарии и общественной гигиены, зав. кафедрой общественной и семейной медицины, факультет медицины и медико-санитарных дисциплин, Малайзийский университет штата Сабах, Кота-Кинабалу, Малайзия;

Джеффри М.С., магистр социальной медицины, преподаватель кафедры общественной и семейной медицины, декан факультета медицины и медико-санитарных дисциплин, Малайзийский университет штата Сабах, Кота-Кинабалу, Малайзия;

Азар З.И., доктор санитарии и общественной гигиены, преподаватель кафедры медицины здравоохранения, факультет медицины, Технологический университет MARA, Шах-Алам, Малайзия;

Гази Х.Ф., кандидат наук, доцент, Колледж по подготовке среднего медицинского персонала, Университет Аль-Баян, Багдад, Ирак;

Хассан М.Р., кандидат наук, зав. кафедрой здравоохранения, Национальный университет Малайзии, Куала-Лумпур, Малайзия.

Authors:

Wan Ismail W.R., Doctor of Public Health, Department of Community Health, National University of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia;

Abdul Majid M.Sh., Doctor of Public Health, Department of Community Health, National University of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia;

Li H.Y., Master of Community Health Science, Department of Community Health, National University of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia;

Madrim M.F., Doctor of Public Health, Lecturer, Department of Community and Family Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Malaysia;

Abdul Rahim S.Sh.S., Doctor of Public Health, Head of the Department of Community and Family Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Malaysia;

Jeffree M.S., Master of Community Medicine, Professor, Department of Community and Family Medicine, Dean of the Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Malaysia;

Azhar Z.I., Doctor of Public Health, Lecturer, Department of Public Health Medicine, Faculty of Medicine, Universiti Teknologi MARA, Shah Alam, Malaysia;

Ghazi H.F., PhD, Associate Professor, College of Nursing, Al-Bayan University, Baghdad, Iraq;

Hassan M.R., PhD, Head of the Department of Community Health, National University of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

В.Д. Беленюк¹, А.А. Савченко^{1,2}, А.Г. Борисов¹, И.В. Кудрявцев³

¹ НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия

² ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение фенотипического состава В-лимфоцитов периферической крови у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) в динамике послеоперационного лечения в зависимости от исхода заболевания. Обследовано 52 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП. Забор крови производили перед операцией (в дооперационный период), а также на 7-е, 14-е и 21-е сутки послеоперационного периода. В зависимости от исхода заболевания в послеоперационном периоде все больные РГП были разделены на две группы: пациенты с благоприятным ($n = 34$) и с неблагоприятным ($n = 18$) исходом заболевания. В качестве контроля обследовано 68 здоровых людей. Исследование фенотипа В-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами. Установлено, что в дооперационном периоде у больных РГП на фоне низкого абсолютного уровня В-лимфоцитов в крови выявляется понижение содержания В1-клеток по сравнению с контрольными значениями. При этом у больных с неблагоприятным исходом РГП наблюдается более высокое количество активированных (по CD23) В1-лимфоцитов в крови, чем у пациентов с благоприятным исходом заболевания. В наблюдаемом периоде после операции (7–21 сутки) динамика изменений содержания В-лимфоцитов значительно различается в зависимости от исхода заболевания. У больных с благоприятным исходом РГП в течение послеоперационного периода наблюдается снижение количества большинства субпопуляций В-лимфоцитов (в том числе и активированных клеток), тогда как уровни содержания различных фракций В-клеток у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания в послеоперационном периоде практически не меняются. В течение всего послеоперационного периода количество общих В-лимфоцитов, наивных В-клеток и В2-лимфоцитов, неэкспрессирующих и экспрессирующих рецептор CD23, у больных с неблагоприятным исходом РГП выше, чем у лиц с благоприятным исходом заболевания. Содержание некоторых других фракций В-лимфоцитов у больных с неблагоприятным исходом также выше, чем при благоприятном исходе РГП, но только на отдельных стадиях послеоперационного лечения. Предполагается, что установленные особенности в уровнях В-лимфоцитов в крови в зависимости от исхода определяются тем, что у больных с неблагоприятным исходом РГП нарушены процессы дифференцировки и миграции В-клеток в рамках развития иммунного ответа, и это может быть тесно связано с общим пониженным уровнем чувствительности всего организма пациента к послеоперационной антибактериальной терапии.

Ключевые слова: распространенный гнойный перитонит, В-лимфоциты, CD23, послеоперационный период, исход заболевания, иммунофенотипирование.

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12, ФГБУ
НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

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

Для цитирования:

Беленюк В.Д., Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В.
Особенности фенотипа В-лимфоцитов крови в зависимости от исхода
распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет.
2021. Т. 11, № 3. С. 454–462. doi: 10.15789/2220-7619-CBC-1397

Citation:

Belenjuk V.D., Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V. Features
of peripheral blood B-cell subset phenotype are associated with clinical
outcome of widespread purulent peritonitis // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 454–462.
doi: 10.15789/2220-7619-CBC-1397

FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD B-CELL SUBSET PHENOTYPE ARE ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOME OF WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

Belenjuk V.D.^a, Savchenko A.A.^{a,b}, Borisov A.G.^a, Kudryavtsev I.V.^c

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to investigate the phenotypic features of peripheral blood B-lymphocytes in patients with widespread purulent peritonitis (WPP) during postoperative treatment depending on the disease outcome. 52 patients with acute surgical diseases and injuries of the abdominal organs complicated by WPP were examined. Blood sampling was performed before surgery (preoperative period), as well as on day 7, 14 and 21 of the postoperative period. All patients with WPP were divided into two groups depending on the disease outcome during postoperative period: patients with favorable outcome (n = 34), patients with unfavorable outcome (n = 18). 68 healthy subjects were included into control group. Immunophenotyping of blood B-lymphocytes was assessed by flow cytometry and direct immunofluorescence of whole peripheral blood stained with monoclonal antibodies. It was found that patients with WPP in preoperative period contained lowered B1-cell subset compared to control group that was paralleled with low absolute B-lymphocyte count. Moreover, a higher number of activated (based on upregulated CD23 expression) peripheral blood B1-lymphocytes was observed in the patients with unfavorable than in patients with favorable WPP outcome. In addition, dynamics of changes in frequency of B-lymphocytes during postoperative period (day 7–21) varied profoundly depending on the disease outcome. In particular, patients with favorable WPP outcome during postoperative period were found to contain decreased percentage of the most B-cell subsets (including activated cells) examined, whereas patients with unfavorable disease outcome had virtually unaltered B-cell composition in the postoperative period. Moreover, count of total B-cells, naive B-cells and B2-cells negative or positive for CD23 expression was higher in patients with unfavorable outcome than in patients with favorable WPP outcome throughout entire postoperative period. Percentage of some other B-cell subsets in patients with unfavorable than with favorable outcome was also higher only at certain stages of postoperative treatment. It is assumed that such features in peripheral blood B-cell subset composition were closely linked to the disease outcome so that patients with unfavorable WPP outcome turned out to have disturbed B-cell maturation and migration in developing immune response that might be due to lowered total sensitivity of host body to postoperative antibiotic therapy.

Key words: *widespread purulent peritonitis, B-cell, CD23 expression, postoperative period, outcome of the disease, immunophenotyping.*

Введение

Гнойно-септические заболевания, даже на фоне постоянно совершенствующихся методов хирургического лечения, а также увеличения количества антибактериальных средств и препаратов, купирующих воспалительный процесс, продолжают каждый год уносить огромное количество жизней [1, 5, 11]. Одним из наиболее проблемных заболеваний абдоминальной хирургии в настоящее время является распространенный гнойный перитонит (РГП), летальность при котором может варьироваться в пределах от 10 до 30%, а при генерализации воспаления, развитии сепсиса и полиорганной недостаточности (ПОН) достигает 80–90% [12, 14, 19].

Характер течения РГП и особенности развития различных осложнений, как правило, определяются не только тяжестью основного патологического процесса и адекватностью проводимого лечения, но и во многом зависят от изменений, происходящих в иммунной системе [3, 15, 17, 29]. Значительное количество исследований в отношении иммунопатогенеза РГП посвящено характеристике механизмов врожденного иммунитета [4, 5, 8, 18]. В то же время не менее важную роль играют патогенетические изменения в адаптивном иммунитете, одним

из основных компонентов которого являются В-лимфоциты. Однако исследования, посвященные функциональному и фенотипическому составу В-лимфоцитов при перитонитах, весьма немногочисленны. Так, в работе Tomasdottir V. и соавт. (2014) доказано, что более эффективное восстановление иммунного гомеостаза при экспериментальном перитоните наблюдается при повышении количества В1-клеток [25]. В проведенных нами ранее исследованиях было выявлено, что уровень В1-лимфоцитов в периферической крови повышается только у больных с неблагоприятным исходом РГП, тогда как при благоприятном исходе заболевания на фоне отсутствия изменений в субпопуляционном составе В-лимфоцитов наблюдается повышение Th2-клеток [3]. Необходимо отметить, что среди В1-лимфоцитов выделяют популяцию клеток, которые способны синтезировать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, что способствует повышению эффективности функционирования врожденного противобактериального иммунитета [20]. В свою очередь, само созревание В-лимфоцитов при развитии перитонита и его осложнений связывают с функциональной активностью Т-фолликулярных хелперных клеток [21]. Следовательно, содержание

В-лимфоцитов в крови, а также их субпопуляционный состав характеризуют как эффекторные, так и регуляторные механизмы иммунного ответа при перитоните. Именно поэтому целью нашего исследования стало изучение фенотипического состава В-лимфоцитов периферической крови у больных РГП в динамике послеоперационного лечения в зависимости от исхода заболевания.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» обследовано 52 пациента в возрасте 25–65 лет (средний возраст пациентов составил 49,6 лет) с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП. Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез. Объем оперативного вмешательства и количество санаций определялись лечащим врачом в зависимости от состояния больного. Забор крови производили перед операцией (в дооперационный период), а также на 7-е, 14-е и 21-е сутки послеоперационного периода. В зависимости от исхода заболевания в послеоперационном периоде все больные РГП были разделены на две группы: группа 1 — больные с благоприятным исходом заболевания ($n = 34$), группа 2 — больные с неблагоприятным исходом ($n = 18$). В качестве контроля обследовано 68 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа В-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами (Beckman Coulter, США), мечеными FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD27-PC5/CD45-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [24]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (Q1 и Q3). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Уилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test). Для оценки изменений исследуемых показателей в динамике послеоперационного лечения также применялся ранговый дисперсионный анализ Фридмана (Friedman ANOVA by ranks). Статистический анализ осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

Показано, что абсолютное содержание лимфоцитов периферической крови у больных РГП снижено по сравнению с контрольными значениями уже в дооперационном периоде, не зависит от исхода заболевания и восстанавливается лишь к 21-м суткам послеоперационного лечения (табл. 1). При исследовании фенотипа В-лимфоцитов крови у больных РГП обнаружено, что в дооперационном периоде процентное содержание CD19⁺-клеток у обследованных пациентов соответствует контрольным значениям и также не зависит от исхода заболевания. В послеоперационном периоде при благоприятном исходе РГП (группа 1) наблюдается последовательное снижение доли В-клеток как в сравнении с контрольным диапазоном, так и с исходными значениями ($\chi^2 = 11,10$, $p = 0,011$). При неблагоприятном исходе заболевания (группа 2) уже на 7-е сутки послеоперационного периода наблюдается увеличение уровня В-клеток по сравнению с контролем с последующей нормализацией их содержания к 14-м суткам. Следует отметить, что в течение всего послеоперационного периода при неблагоприятном исходе РГП наблюдается повышение количества CD19⁺-клеток по сравнению с тем же показателем у больных с благоприятным исходом (табл. 1). В дальнейшем нами был проведен анализ субпопуляционного состава В-лимфоцитов в указанных группах больных, результаты которого приведены в таблице 1. Так, динамика изменений уровней наивных

CD27⁻ В-клеток у больных РГП соответствует выявленным по CD19⁺-лимфоцитам в группах с благоприятным ($\chi^2 = 11,96$, $p = 0,010$) и неблагоприятным исходом заболевания. Доля В-клеток памяти, несущих CD27 на своей мембране, при неблагоприятном исходе РГП на протяжении всех сроков наблюдения соответствует контрольному диапазону, тогда как у лиц с благоприятным исходом РГП понижается на 21-е сутки послеоперационного лечения. Что же касается CD5⁺ В-лимфоцитов, то у больных с благоприятным исходом РГП их содержание ниже, чем у людей в контрольной группе в течение всего периода обследования. В то же время у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания сниженное содержание данной популяции клеток нормализуется в течение 2 недель послеоперационного периода, а затем снова значительно понижается, в том числе по сравнению с уровнем, выявленным при благоприятном исходе. Уровень лимфоцитов CD19⁺CD5⁻ в крови у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде и в первую неделю послеоперационного пе-

риода соответствует контрольным значениям, к концу периода наблюдения снижается до минимума ($\chi^2 = 8,90$, $p = 0,019$). При неблагоприятном исходе заболевания процентное содержание клеток CD19⁺CD5⁻ в течение всего периода наблюдения соответствует контрольному диапазону, но начиная с 7-х суток значительно превышает уровень данного показателя у пациентов с благоприятным исходом (табл. 1).

В ходе дальнейших исследований нами оценивался уровень «активированных» CD23⁺ клеток в рамках указанных выше популяций В-лимфоцитов (табл. 2). Показано, что содержание CD23⁺ В-клеток в крови при РГП в дооперационном периоде соответствует контрольному диапазону и не зависит от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП уровень В-лимфоцитов с данным фенотипом (по сравнению с контрольными значениями) последовательно снижается с 7-х суток послеоперационного периода и достигает минимума к концу периода обследования ($\chi^2 = 11,50$, $p = 0,010$). У больных с неблагоприятным исходом РГП на 7-е сутки наблюдается повышение содержа-

Таблица 1. Содержание В-лимфоцитов в крови у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1–Q3)

Table 1. Composition of peripheral blood B-lymphocytes in patients with WPP during postoperative period (Me, Q1–Q3)

Показатели Parameters	Гр. Gr.	Контроль Control	Дооперационный период Preoperative period	7-е сутки после операции Day 7 after surgery	14-е сутки после операции Day 14 after surgery	21-е сутки после операции Day 21 after surgery
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /L	1	2,05 1,56–2,60	1,06 (0,78–1,33)***	1,32 (0,83–2,53)***	1,34 (0,90–2,08)***	2,15 (1,35–3,89)
	2		0,92 (0,51–1,25)***	0,87 (0,70–1,81)***	1,06 (0,65–1,11)***	2,06 (1,27–2,85)
CD19 ⁺ , %	1	12,0 9,4–14,6	10,8 (7,2–17,4)	9,0 (5,9–14,3)	7,7 (5,3–11,3)**	4,6 (2,0–7,9)**
	2		12,4 (8,1–22,5)	21,7 (16,0–21,4)** #	17,7 (10,0–20,0)#	10,5 (7,5–13,4)#
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	1	11,0 8,1–14,5	8,9 (5,2–12,1)	7,0 (4,8–8,0)***	5,5 (4,2–9,1)**	3,2 (1,8–5,2)**
	2		9,0 (5,9–18,4)	20,2 (10,9–28,9)* ##	15,2 (9,4–15,8)##	8,0 (4,2–11,9)##
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	1	2,5 1,7–5,2	2,1 (1,2–5,3)	2,2 (1,2–2,7)	1,7 (0,8–2,7)	0,8 (0,2–1,7)*
	2		3,1 (1,3–3,9)	2,0 (1,5–4,2)	2,1 (1,3–2,3)	2,5 (1,6–3,6)
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1	1,7 1,3–3,8	0,6 (0,4–1,7)***	0,8 (0,5–1,5)***	0,5 (0,4–0,9)***	0,8 (0,3–1,7)**
	2		0,8 (0,4–2,4)*	1,8 (1,1–2,5)#	1,5 (0,8–2,7)#	0,4 (0,2–0,5)* #
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	1	10,9 8,6–15,3	10,4 (6,6–16,0)	8,5 (5,3–13,2)	7,9 (4,7–10,7)*	3,7 (1,8–6,2)**
	2		10,7 (7,6–20,8)	18,2 (14,8–29,9)##	15,7 (8,8–17,1)#	10,0 (7,0–13,0)##

Примечания. Гр. — группа: 1 — больные с благоприятным исходом РГП, 2 — больные с неблагоприятным исходом РГП; * — статистически значимые различия с показателями контрольной группы (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$); # — статистически значимые различия между показателями больных с благоприятным и неблагоприятным исходом РГП (# — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$, ### — $p < 0,001$).

Notes. Gr. — group: 1 — patients with favorable outcome, 2 — patients with unfavorable WPP outcome; * — significant differences compared to control group (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$); # — significant differences between compared parameters in patients with favorable and unfavorable WPP outcome (# — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$, ### — $p < 0,001$).

ния «активированных» В-клеток по сравнению с контрольными значениями с последующим снижением до исходного уровня. Более того, у больных с неблагоприятным исходом РГП в течение всего послеоперационного периода уровень этих клеток превышает значения, полученные для пациентов с благоприятным исходом данного заболевания.

Значения, полученные для CD27⁺CD23⁺ В-лимфоцитов у РГП до операции, соответствуют контрольным и не зависят от исхода заболевания (табл. 2). Так, в послеоперационном периоде у пациентов с благоприятным исходом содержание данной популяции В-клеток снижается, достигая минимума к концу наблюдаемого периода, тогда как у больных с неблагоприятным исходом — повышается. Что же касается В-клеток памяти, то у больных с благоприятным исходом РГП до операции снижено содержание CD27⁺CD23⁺ В-клеток по сравнению с контрольным уровнем, а в послеоперационном периоде достигает контрольного диапазона. При неблагоприятном исходе уровень этих клеток в циркуляции в течение всего наблюдаемого периода находится в пределах контрольного диапазона.

У больных с благоприятным исходом РГП процентное содержание CD5⁺CD23⁺ В-клеток до операции и на первой неделе послеоперационного периода ниже контрольного уровня и значений, выявляемых при неблагоприятном исходе, но к 21-м суткам лечения достигает контрольного диапазона (табл. 2). У больных с неблагоприятным исходом к концу наблюдаемого периода отмечается значительное снижение В-лимфоцитов данной популяции по сравнению с показателями контрольной группы. В рамках общего пула CD5⁺ В-лимфоцитов содержание CD23⁺ клеток в циркуляции у больных РГП до операции соответствует контрольному диапазону. При благоприятном исходе в послеоперационном периоде выявляется последовательное снижение количества В-лимфоцитов данного фенотипа ($\chi^2 = 9,90$, $p = 0,019$). Тем не менее у пациентов с неблагоприятным исходом на протяжении всего послеоперационного периода отмечается повышенное содержание CD19⁺CD5⁺CD23⁺-лимфоцитов как по сравнению с контрольным диапазоном, так и с данным показателем у больных с благоприятным исходом РГП.

Таблица 2. Содержание В-лимфоцитов с экспрессией CD23⁺ у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1–Q3)

Table 2. Frequency of CD23⁺ peripheral blood B-lymphocytes in patients with WPP during postoperative period (Me, Q1–Q3)

Показатели Parameters	Гр. Gr.	Контроль Control	Дооперационный период Preoperative period	7-е сутки после операции Day 7 after surgery	14-е сутки после операции Day 14 after surgery	21-е сутки после операции Day 21 after surgery
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /L	1	0,23 (0,17–0,30)	0,12 (0,07–0,22)**	0,12 (0,08–0,20)***	0,09 (0,07–0,18)**	0,09 (0,07–0,14)**
	2		0,12 (0,08–0,16)**	0,18 (0,12–0,24)	0,15 (0,10–0,20)	0,17 (0,13–0,20)*
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , %	1	12,6 (10,4–17,9)	8,2 (5,7–16,2)	7,4 (5,2–8,7)**	5,1 (3,7–8,0)**	4,3 (1,9–7,4)**
	2		11,1 (3,2–26,8)	24,7 (13,3–33,7)* ##	10,7 (7,1–14,8)#	13,3 (10,4–17,3)##
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , %	1	10,6 (7,1–12,2)	8,4 (5,7–14,3)	6,6 (5,1–7,4)*	4,1 (3,2–5,3)**	2,9 (1,6–4,9)**
	2		9,5 (5,4–22,8)	22,8 (18,7–27,9)* ###	12,0 (4,7–15,3)#	11,8 (7,3–13,4)##
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , %	1	2,0 (1,4–4,6)	1,0 (0,4–1,4)**	1,2 (0,7–2,1)	1,0 (0,4–2,4)	1,2 (0,3–2,6)
	2		2,1 (0,6–3,1)	2,0 (1,1–2,8)	1,5 (1,1–2,0)	1,5 (1,0–2,1)
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , %	1	1,6 (1,0–3,8)	0,6 (0,3–1,7)*	0,5 (0,4–1,5)*	0,6 (0,4–0,9)**	1,0 (0,4–1,7)
	2		1,5 (0,1–3,2)#	1,9 (1,0–2,4)#	0,6 (0,1–1,0)*	0,3 (0,2–0,9)**
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , %	1	10,2 (8,0–13,4)	7,6 (5,4–14,1)	5,0 (3,1–8,3)**	4,5 (3,2–7,2)**	3,6 (1,7–5,8)**
	2		9,6 (3,1–22,6)	22,6 (12,0–31,3)* ###	10,1 (6,5–13,5)##	13,0 (9,0–15,8)###

Примечание. То же, что и для табл. 1.

Notes are similar to those shown by Table 1.

Обсуждение

Важную роль в развитии РГП играет не только фактор инфицирования, но и неспособность иммунной системы к локализации очага бактериальной агрессии и эффективной элиминации патогена [4, 15]. Как следствие, реактивность организма при иммуновоспалительной реакции на бактериальную инфекцию (основной этиологический фактор при РГП) будет обусловлена механизмами гуморального иммунитета и, соответственно, функциональной активностью В-лимфоцитов.

В зависимости от исхода заболевания у больных РГП в дооперационном и послеоперационном периоде различается содержание В-лимфоцитов в периферической крови. Так, при благоприятном исходе РГП уровень В-клеток снижен в течение всего периода обследования. Относительное содержание В-лимфоцитов в крови у больных данной группы в дооперационном периоде и через 7 суток после операции соответствовало контрольному диапазону, но с 14-х суток послеоперационного лечения последовательно снижалось. При неблагоприятном исходе РГП у обследованных пациентов в дооперационном периоде выявляется понижение абсолютного содержания В-клеток, после операции их количество повышается до контрольного уровня. На 21-е сутки послеоперационного лечения у больных с неблагоприятным исходом заболевания наблюдается относительно высокий абсолютный уровень В-лимфоцитов по сравнению со значениями, выявленными у пациентов с благоприятным исходом РГП. Только на 7-е сутки послеоперационного лечения у больных с неблагоприятным исходом РГП отмечается высокое процентное содержание В-лимфоцитов в крови по сравнению с контрольными значениями, но в течение всего послеоперационного периода — повышенное относительно значений, выявленных у пациентов с благоприятным исходом заболевания.

Для оценки активации В-лимфоцитов периферической крови на их поверхностной мембране определялся уровень экспрессии CD23, который является низкоаффинным рецептором к IgE и экспрессируется на мембране функционально-активированных В-клеток [13, 26]. У больных с благоприятным исходом РГП уже на 7-е сутки после операции содержание активированных В-лимфоцитов снижено по сравнению с контрольными значениями и продолжает понижаться к 21-м суткам лечения. У пациентов с неблагоприятным исходом заболевания на 7-е сутки после операции количество CD23⁺ В-клеток повышено как по сравнению с контрольным диапазоном, так и со значениями при благоприятном исходе РГП. В дальнейшем

у больных с неблагоприятным исходом РГП уровень активированных В-лимфоцитов остается повышенным по сравнению с обнаруженным при благоприятном исходе заболевания.

Значительные различия в зависимости от исхода заболевания наблюдаются не только в уровне активации В-клеток, но и в их субпопуляционном составе. Так, у больных РГП с благоприятным исходом содержание наивных В-клеток уже на 7-е сутки послеоперационного периода понижено по сравнению с контрольными значениями и продолжает понижаться к концу наблюдаемого периода. Через неделю после операции у лиц данной группы также снижается содержание активированных наивных В-лимфоцитов (CD19⁺CD27⁻CD23⁺), которое остается на низком уровне уже до конца наблюдаемого периода. У пациентов с неблагоприятным исходом на 7-е сутки после операции отмечается повышенный уровень наивных В-лимфоцитов как по сравнению с контрольными значениями, так и с показателями больных с благоприятным исходом. На 2-й и 3-й неделе лечения количество наивных В-лимфоцитов и активированных наивных В-клеток у лиц с неблагоприятным исходом РГП соответствует контрольному диапазону, но остается повышенным по сравнению с показателями больных с благоприятным исходом заболевания.

Только на 21-е сутки послеоперационного лечения у больных с благоприятным исходом РГП выявляется понижение В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺) по сравнению с контрольными значениями. Изменение в содержании активированных В-лимфоцитов памяти (CD19⁺CD27⁺CD23⁺) у больных данной группы практически обратно изменению фракции CD19⁺CD27⁺-клеток: данный показатель снижен по сравнению с контрольными значениями в дооперационном периоде и полностью соответствует контрольному уровню в течение всего послеоперационного периода. Вместе с этим у пациентов при неблагоприятном исходе заболевания в течение всего наблюдаемого периода содержание В-клеток памяти и активированных В-лимфоцитов памяти соответствует контрольному диапазону.

В настоящее время возрастает количество исследований, посвященных роли В1-лимфоцитов при различных иммуновоспалительных процессах [7, 16, 23]. В работе Yong L. и соавт. (2019) показано, что при шистосомной инфекции низкое количество общих В-лимфоцитов коррелирует с активацией формирования гранулем, уровнем воспаления и фиброза в печени [28]. В то же время увеличение содержания В1-клеток в печени сопровождается снижением уровней экспрессии хемокинов и провоспалительных цитокинов, что приводит к ингибированию воспалительной реакции и фиброза в печени. Кроме того, в настоящее время в составе В1-лимфоцитов вы-

деляют фракцию В-регуляторных клеток [6, 22, 27]. При благоприятном исходе РГП содержание В1-лимфоцитов снижено до и во время всего послеоперационного лечения. Уровень активированных В1-клеток также понижен в дооперационном периоде и в течение первых 14 суток послеоперационного периода, но к 21-м суткам лечения повышается до контрольных значений. При неблагоприятном исходе РГП содержание В1-клеток также понижено в дооперационном периоде. Затем в течение 2 недель послеоперационного лечения уровень В1-клеток повышается до контрольного диапазона, превышая показатели пациентов с благоприятным исходом заболевания, но на 21-е сутки наблюдается значительное снижение их количества. Количество активированных В1-клеток при неблагоприятном исходе повышено в начале наблюдаемого периода и снижается по сравнению с контрольными значениями во второй половине послеоперационного лечения.

Динамика В2-лимфоцитов у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационный и послеоперационный период полностью повторяет изменения в общей популяции В-клеток периферической крови. Это определяется тем, что В2-клетки составляют основную фракцию В-лимфоцитов крови [9, 25]. В частности, у пациентов с благоприятным исходом РГП доля В2-клеток в составе общих В-лимфоцитов составляет от 96,3% (в дооперационном периоде) до 80,4% (на 21-е сутки послеоперационного лечения). Соответственно, динамика изменения количества активированных В2-клеток в дооперационном и послеоперационном периоде у лиц с благоприятным исходом заболевания также повторяет изменения в содержании общих В2-лимфоцитов. При неблагоприятном исходе заболевания наблюдается повышение содержания В2-лимфоцитов в течение всего послеоперационного периода по сравнению с показателями, выявленными у пациентов с благоприятным исходом, что не соответствует динамике изменений содержания общих В-клеток. В то же время динамика изменений количества активированных В2-лимфоцитов полностью соответствует динамике уровней активированных В-лимфоцитов.

В целом анализ особенностей динамики фенотипического состава В-лимфоцитов периферической крови у больных РГП с разным вариантом исхода заболевания позволяет выделить некоторые закономерности. Во-первых, у больных с благоприятным исходом РГП в послеоперационном периоде выявляется последовательное изменение содержания В-лимфоцитов в крови (процентное содержание общих В-лимфоцитов, активированных В-клеток, наивных В-клеток, количество В2-лимфоцитов и активированных В2-лимфоцитов), что доказано с помощью ран-

гового дисперсионного анализа Фридмана, комплексно характеризующего индивидуальные изменения показателей в динамике. Причем содержание В-клеток к концу наблюдений только снижается. Подобные изменения указывают на отсутствие усиленного выхода при индукции воспаления наивных CD19⁺ клеток из красного костного мозга, способного нарушить эффективность антиген-независимой дифференцировки этих клеток, и избыточной активации В-клеточного звена специфического иммунитета, что, возможно, и определяет благоприятный исход заболевания. В частности, на примере миграции нейтрофилов в очаг воспаления доказана эффективность воспалительной реакции при перитоните [10]. Во-вторых, у больных с благоприятным исходом заболевания РГП в процессе послеоперационного лечения большинство исследуемых показателей ниже, чем у пациентов с неблагоприятным исходом (общие В-лимфоциты, наивные В-клетки, В1- и В2-лимфоциты, активированные В-лимфоциты, CD23⁺ активированные наивные В-клетки, активированные В1- и В2-лимфоциты). По-видимому, такое соотношение содержания В-лимфоцитов в крови при РГП подтверждает недостаточный уровень миграции для реализации иммунного ответа при неблагоприятном исходе заболевания.

Заключение

Установлены особенности фенотипического состава В-лимфоцитов периферической крови у больных РГП в зависимости от исхода заболевания. В дооперационном периоде у больных РГП на фоне низкого абсолютного уровня В-лимфоцитов в крови выявляется понижение содержания В1-клеток по сравнению с контрольными значениями. При этом у больных с неблагоприятным исходом РГП наблюдается более высокое количество активированных (по CD23) В1-лимфоцитов в крови, чем у пациентов с благоприятным исходом заболевания. В наблюдаемом периоде после операции (7–21 сутки) динамика изменений содержания В-лимфоцитов значительно различается в зависимости от исхода заболевания. У больных с благоприятным исходом РГП в течение послеоперационного периода наблюдается снижение количества большинства субпопуляций В-лимфоцитов (в том числе и активированных клеток), тогда как уровни содержания различных фракций В-клеток у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания в послеоперационном периоде практически не меняются. Кроме того, в течение всего послеоперационного периода количество общих В-лимфоцитов, наивных В-клеток и В2-лимфоцитов, неэкспрессирующих и экспрессирующих рецептор

CD23, у больных с неблагоприятным исходом РГП выше, чем у лиц с благоприятным исходом заболевания. Содержание некоторых других фракций В-лимфоцитов у больных с неблагоприятным исходом также выше, чем при благоприятном исходе РГП, но только на отдельных стадиях послеоперационного лечения. Предполагается, что установленные особенности в уровнях В-лимфоцитов в крови в зависимости от исхода определяются тем, что у больных с неблагоприятным исходом РГП нарушены процессы дифференцировки и ми-

грации В-клеток в рамках развития иммунного ответа, что может быть тесно связано с общим пониженным уровнем чувствительности всего организма пациента к послеоперационной антибактериальной терапии. Таким образом, исследование механизмов миграции клеток иммунной системы при развитии РГП (в том числе и на фоне антибактериальной терапии) позволит разработать новые иммунотерапевтические методы, направленные на повышение эффективности иммунного ответа и, соответственно, послеоперационного лечения.

Список литературы/References

1. Гасанов М.Дж. Формирование алгоритмов для определения степени тяжести эндотоксикоза при перитонитах // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2015. № 1. С. 54–57. [Gasanov M.Dzh. Formation of algorithms to determine the severity of endotoxemia in peritonitis. *Khirurgija. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Pirogov Russian Journal of Surgery*, 2015, no. 1, pp. 54–57. doi: 10.17116/hirurgia2015154-57 (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryatsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medicinskaja immunologija = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]
3. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Кудрявцев И.В. Состояние клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 63–70. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitoveckij D.E., Kudryatsev I.V. The cellular and humoral immunity state depending on the outcome of a widespread purulent peritonitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 63–70. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-63-70 (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 51–60. [Savchenko A.A., Gvozdev I.I., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryatsev I.V., Moshev A.V. Phagocytic activity and blood neutrophils respiratory burst state features amongst widespread purulent peritonitis patients in the postoperative period dynamics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 51–60. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-51-60 (In Russ.)]
5. Савченко А.А., Здзитовецкий А.Г., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Вестник Российской академии медицинских наук. 2014. № 4–5. С. 23–28. [Savchenko A.A., Zdzitoveckij D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, no. 4–5, pp. 23–28. doi: 10.15690/vramn.v69i5-6.1039 (In Russ.)]
6. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Грищенко Н.В., Рябчиков Д.А., Гривцова Л.Ю., Базин И.С., Тупицын Н.Н. Ключевая роль популяций В1-лимфоцитов в иммунном ответе у больных раком желудка // Российский биотерапевтический журнал. 2018. Т. 17, № 4. С. 64–70. [Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Grishchenko N.V., Ryabchikov D.A., Grivtsova L.Y., Bazin I.S., Tupitsyn N.N. The role of B-1 lymphocytes in antitumor immunity in patients with gastric cancer. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, vol. 17, no. 4, pp. 64–70. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70 (In Russ.)]
7. Bisht N., Khatri V., Chauhan N., Kalyanasundaram R. Cystatin from filarial parasites suppress the clinical symptoms and pathology of experimentally induced colitis in mice by inducing T-regulatory cells, B1-cells, and alternatively activated macrophages. *Biomedicine*, 2019, 7(4): 85. doi: 10.3390/biomedicine7040085
8. Brook A.C., Jenkins R.H., Clayton A., Kift-Morgan A., Raby A.C., Shephard A.P., Mariotti B., Cuff S.M., Bazzoni F., Bowen T., Fraser D.J., Eberl M. Neutrophil-derived miR-223 as local biomarker of bacterial peritonitis. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1: 10136. doi: 10.1038/s41598-019-46585-y
9. Chen L., Ishigami T., Nakashima-Sasaki R., Kino T., Doi H., Minegishi S., Umemura S. Commensal microbe-specific activation of B2 cell subsets contributes to atherosclerosis development independently of lipid metabolism. *EBioMedicine*, 2016, vol. 13, pp. 237–247. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.030
10. De Souza Costa M., Teles R.H.G., Dutra Y.M., Neto J.C.R.M., de Brito T.V., de Sousa Nunes Queiroz F.F., do Vale D.B.N., de Souza L.K.M., Silva I.S., Dos Reis Barbosa A.L., Medeiros J.R., Parizotto N.A., de Carvalho Figueiras M. Photobiomodulation reduces neutrophil migration and oxidative stress in mice with carrageenan-induced peritonitis. *Lasers Med. Sci.*, 2018, vol. 33, no. 9, pp. 1983–1990. doi: 10.1007/s10103-018-2569-7
11. Ding W., Wang K., Liu B., Fan X., Wang S., Cao J., Wu X., Li J. Open Abdomen improves survival in patients with peritonitis secondary to acute superior mesenteric artery occlusion. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2017, vol. 51, no. 9, pp. e77–e82. doi: 10.1097/MCG.0000000000000799
12. Elfessi Z., Liu E., Dukarevich Y., Caniff K., Marquez K., Shabbir Z. Sepsis induced bacterial peritonitis caused by *Granulicatella adiacens*. *Am. J. Emerg. Med.*, 2019, vol. 37, no. 12: 2263.e1–2263.e3. doi: 10.1016/j.ajem.2019.158428
13. Jégouzo S.A.F., Feinberg H., Morrison A.G., Holder A., May A., Huang Z., Jiang L., Lasanajak Y., Smith D.F., Werling D., Drickamer K., Weis W.I., Taylor M.E. CD23 is a glycan-binding receptor in some mammalian species. *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 41, pp. 14845–14859. doi: 10.1074/jbc.RA119.010572

14. Mačiulienė A., Maleckas A., Kriščiukaitis A., Mačiulis V., Vencius J., Macas A. predictors of 30-day in-hospital mortality in patients undergoing urgent abdominal surgery due to acute peritonitis complicated with sepsis. *Med. Sci. Monit.*, 2019, vol. 25, pp. 6331–6340. doi: 10.12659/MSM.915435
15. Mai M., Stengel S., Al-Herwi E., Peter J., Schmidt C., Rubio I., Stallmach A., Bruns T. Genetic variants of TRAF6 modulate peritoneal immunity and the risk of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a combined prospective-retrospective study. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 4914. doi: 10.1038/s41598-017-04895-z
16. Morris G., Puri B.K., Olive L., Carvalho A.F., Berk M., Maes M. Emerging role of innate B1 cells in the pathophysiology of autoimmune and neuroimmune diseases: Association with inflammation, oxidative and nitrosative stress and autoimmune responses. *Pharmacol. Res.*, 2019, vol. 148: 104408. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104408
17. Mustafa-Kamal F., Liu H., Pedersen N.C., Sparger E.E. Characterization of antiviral T cell responses during primary and secondary challenge of laboratory cats with feline infectious peritonitis virus (FIPV). *BMC Vet. Res.*, 2019, vol. 15: 165. doi: 10.1186/s12917-019-1909-6
18. Nieto J.C., Sánchez E., Romero C., Román E., Poca M., Guarner C., Juárez C., Soriano G., Vidal S. Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, vol. 98, no. 5, pp. 819–825. doi: 10.1189/jlb.3AB0315-106R
19. Obi Y., Streja E., Mehrotra R., Rivara M.B., Rhee C.M., Soohoo M., Gillen D.L., Lau W.L., Kovesdy C.P., Kalantar-Zadeh K. Impact of obesity on modality longevity, residual kidney function, peritonitis, and survival among incident peritoneal dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2018, vol. 71, no. 6, pp. 802–813. doi: 10.1053/j.ajkd.2017.09.010
20. Rauch P.J., Chudnovskiy A., Robbins C.S., Weber G.F., Etzrodt M., Hilgendorf I., Tiglaio E., Figueiredo J.L., Iwamoto Y., Theurl I., Gorbатов R., Waring M.T., Chicoine A.T., Mouded M., Pittet M.J., Nahrendorf M., Weissleder R., Swirski F.K. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*, vol. 335, no. 6068, pp. 597–601. doi: 10.1126/science.1215173
21. Sjaastad F.V., Condotta S.A., Kotov J.A., Pape K.A., Dail C., Danahy D.B., Kucaba T.A., Tygrett L.T., Murphy K.A., Cabrera-Perez J., Waldschmidt T.J., Badovinac V.P., Griffith T.S. Polymicrobial sepsis chronic immunoparalysis is defined by diminished ag-specific t cell-dependent b cell responses. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2532. doi: 10.3389/fimmu.2018.02532
22. Soares R.R., Antinarelli L.M.R., Abramo C., Macedo G.C., Coimbra E.S., Scopel K.K.G. What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis? *Pathog. Glob. Health*, 2017, vol. 111, no. 3, pp. 107–115. doi: 10.1080/20477724.2017.1308902
23. Soriano F.G., Barbeiro H.V., Barbeiro D.F. Inflammatory response: role of B1 cells. *Shock*, 2013, vol. 39, no. 1, pp. 5–9. doi: 10.1097/SHK.0b013e31828fad82
24. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 2018, vol. 94, no. 1, pp. 1–15. doi: 10.1002/cyto.b.21626
25. Tomasdottir V., Thorleifsdottir S., Vikingsson A., Hardardottir I., Freysdottir J. Dietary omega-3 fatty acids enhance the B1 but not the B2 cell immune response in mice with antigen-induced peritonitis. *J. Nutr. Biochem.*, 2014, vol. 25, no. 2, pp. 111–117. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.010
26. Wu E.K., Henkes Z.I., McGowan B., Bell R.D., Velez M.J., Livingstone A.M., Ritchlin C.T., Schwarz E.M., Rahimi H. TNF-induced interstitial lung disease in a murine arthritis model: accumulation of activated monocytes, conventional dendritic cells, and CD21(+)/CD23(-) B cell follicles is prevented with anti-TNF therapy. *J. Immunol.*, 2019, vol. 203, no. 11, pp. 2837–2849. doi: 10.4049/jimmunol.1900473
27. Yesillik S., Agrawal S., Gollapudi S.V., Gupta S. Phenotypic analysis of CD4⁺ Treg, CD8⁺ Treg, and breg cells in adult common variable immunodeficiency patients. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 2019, vol. 180, no. 2, pp. 150–158. doi: 10.1159/000501457
28. Yong L., Tang Y., Ren C., Liu M., Shen J., Hou X. B1 cells protect against *Schistosoma japonicum*-induced liver inflammation and fibrosis by controlling monocyte infiltration. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2019, 13 (6): e0007474. doi: 10.1371/journal.pntd.0007474
29. Yu W., Yao D., Yu S., Wang X., Li X., Wang M., Liu S., Feng Z., Chen X., Li W., Wang L., Liu W., Ma J., Yu L., Tong C., Song B., Cui Y. Protective humoral and CD4(+) T cellular immune responses of *Staphylococcus aureus* vaccine MntC in a murine peritonitis model. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 3580. doi: 10.1038/s41598-018-22044-y

Авторы:

Беленюк В.Д., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия; профессор кафедры медицинской биологии, ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Belenjuk V.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation; Professor of the Medical Biological Department, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, Scientific Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

ИНДУКЦИЯ ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНСЕРВАТИВНЫМИ ЛИНЕЙНЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЭПИТОПАМИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А

И.А. Сычев¹, П.М. Копейкин¹, Е.В. Цветкова^{1,2}, К.В. Чередова¹, Б.Л. Мильман¹,
О.В. Шамова¹, И.Н. Исакова-Сивак¹, Ю.А. Дешева^{1,2}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Грипп входит в число широко распространенных инфекций, ежегодно наносящих значительный ущерб здоровью населения и экономике страны. Наиболее эффективным способом борьбы с гриппом и его осложнениями является вакцинопрофилактика. Существуют разнообразные вакцины против гриппа, однако все они имеют общие недостатки, к которым относятся узкая специфичность, необходимость ежегодного обновления штаммового состава, не всегда удовлетворительная иммуногенность, а следовательно, и эффективность. В связи с этим пристальное внимание уделяется проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Антитела против нейраминидазы (NA) способны обеспечивать гетеросубтипическую защиту, что важно ввиду потенциальной угрозы со стороны вирусов гриппа, имеющих иные гемагглютинин и нейраминидазу по сравнению с вирусами, циркулирующими в настоящее время. Данное исследование посвящено поиску новых и анализу ранее предсказанных линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных для всех подтипов вируса гриппа А. **Результаты.** Было обнаружено 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы, три из которых (MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP) были синтезированы *de novo*, конъюгированы с бычьим сывороточным альбумином и далее использованы для иммунизации мышей. С помощью иммуноферментного анализа в сыворотках иммунизированных мышей выявлялись специфические IgG антитела к различным вирусам гриппа А, содержащим NA подтипов N1, N2, N3 и N9. Иммунизация NA-пептидами не защитила мышей от существенной потери веса после инфицирования летальным вирусом гриппа H1N1. Тем не менее все иммунизированные мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как в контрольной группе выживаемость составила только 28,6%. Анализ вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных вирусом H1N1, не выявил различий в титрах ни на 4-е, ни на 8-е сутки после заражения. В то же время защитный эффект отсутствовал при заражении мышей летальным вирусом гриппа H7N9: уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы у иммунизированных и контрольных мышей. **Заключение.** Полученные в настоящем исследовании данные показали наличие кросс-реактивности у анти-NA антител, индуцируемых при иммунизации NA-пептидами, а также защитной эффективности в отношении инфекции,

Адрес для переписки:

Сычев Иван Александрович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 904 638-04-18 (моб.).
E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

Contacts:

Ivan A. Sychev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 904 638-04-18 (mobile).
E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

Для цитирования:

Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Чередова К.В., Мильман Б.Л., Шамова О.В., Исакова-Сивак И.Н., Дешева Ю.А. Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 463–472.
doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1343

Citation:

Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A. Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 463–472.
doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1343

вызванной вирусом H1N1, но не вирусом H7N9. Эти результаты указывают на перспективность использования линейных В-клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных вакцин, но при этом требуется более глубокое и полное исследование специфичности консервативных эпитопов NA, а также оптимизация схем иммунизации для достижения более высоких показателей защитной эффективности.

Ключевые слова: вирус гриппа А, иммунный ответ, универсальная гриппозная вакцина, гетеросубтипический иммунный ответ, антинеураминидазные антитела, линейные В-клеточные эпитопы.

INDUCTION OF CROSS-REACTIVE ANTIBODIES IN MICE IMMUNIZED WITH CONSERVED INFLUENZA A VIRUS NEURAMINIDASE-DERIVED LINEAR B-CELL EPITOPES

Sychev I.A.^a, Kopeikin P.M.^a, Tsvetkova E.V.^{a,b}, Cheredova K.V.^a, Milman B.L.^a, Shamova O.V.^a, Isakova-Sivak I.N.^a, Desheva Y.A.^{a,b}

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

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

Abstract. *Introduction.* Influenza is a socially significant infection that causes profound damage to populational health and national economy annually. Preventive vaccination is the most effective means to manage influenza and its complications. Diverse influenza vaccines exist, but their common drawback is the narrow specificity, the need for annual renewal of the strain composition, not always satisfactory immunogenicity and effectiveness. In this regard, close attention is paid to developing universal influenza vaccines aimed to induce cross-reactive immune-related cues against most conserved parts of viral proteins. Antibodies against neuraminidase (NA) are able to provide heterosubtypic protection, which is important due to potential threat posed by influenza viruses differed in hemagglutinin and neuraminidase sequence in comparison to currently circulating viruses. The present study is aimed to search for new and analysis of earlier predicted NA linear B-cell epitopes conserved among all influenza A virus subtypes. *Results.* Eight conserved linear B-cell epitopes were identified around the active site of neuraminidase, three of which (MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC, and DNWKGSNRP) were synthesized *de novo*, conjugated with bovine serum albumin to be next used for mouse immunization. IgG antibodies were detected by ELISA in the sera of immunized mice. Antibodies were found to specifically bind to various influenza A viruses containing NA subtypes N1, N2, N3, and N9. Immunization with NA peptides did not protect mice from substantial body weight loss after infection with lethal H1N1 influenza virus. However, all immunized mice survived during the observation period, whereas in the control group the survival rate was as low as 28.6%. Analyzing lung viral load in the mice infected with the H1N1 virus revealed no differences in virus titers on either day 4 or 8 post-infection. Nevertheless, the protective effect lacked after the mice were challenged with lethal H7N9 influenza virus. Mortality rate, body weight loss, and lung virus titers were comparable in immunized and control mice. *Conclusions.* The data obtained evidenced about serum cross-reactive anti-NA antibodies induced by immunization with NA peptides, as well as protective efficacy against infection caused by H1N1 virus, but not H7N9 virus. Such results hold promise and indicate that NA linear B-cell epitopes can be used for designing epitope-directed influenza vaccines, but a deeper and more comprehensive study on the specificity of conserved NA epitopes, as well as optimization of immunization schemes for achieving higher protective efficacy are required.

Key words: influenza A virus, immune response, universal influenza vaccine, heterosubtypic immune response, antineuraminidase antibodies, linear B-cell epitopes.

Введение

Основными антигенами вируса гриппа являются поверхностные гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Антитела против гемагглютинина обладают нейтрализующей активностью, то есть препятствуют проникновению вируса в клетку и развитию инфекционного процесса. Антинеураминидазные антитела нейтрализующей активностью не обладают, но при этом способны обеспечивать гомологичную и гетерологичную защиту, как было показано еще в 70-х гг. [24, 33]. Кроме того, антитела против нейраминидазы обеспечивают гетеросубтипическую защиту [29], что особенно важно ввиду потенциальной угрозы для людей со стороны вирусов гриппа птиц H5N1 и H7N9, которые могут преодолеть межвидовой барьер и стать возбудителями пандемии гриппа [8]. Вклад анти-

NA-антител в защиту против сезонных вирусов гриппа активно обсуждается в последние годы в связи с острой необходимостью повышения эффективности сезонных противогриппозных вакцин [15, 16, 22].

В настоящее время активная иммунопрофилактика гриппозной инфекции осуществляется с помощью вакцинации населения [25]. Из-за высокой изменчивости вирусов гриппа штаммовый состав гриппозных вакцин необходимо обновлять практически ежегодно. В связи с этим актуальной задачей является усовершенствование существующих гриппозных вакцин с целью расширения их спектра действия. В 2013 г. Т. Дойл и соавт. [14] описали один из В-клеточных эпитопов в NA, консервативный для всех подтипов вируса гриппа А. Моноклональные антитела, полученные против данного эпитопа, эффективно ингибировали

ли *in vitro* активность вирусов гриппа А всех подтипов NA, а также защищали мышей от летальной инфекции. В данной работе мы расширили это исследование, предсказав новые консервативные эпитопы NA вирусов гриппа А и оценив иммуногенность и кросс-реактивность некоторых из них, с целью разработки противогриппозной вакцины широкого спектра действия.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали следующие эпидемические и реассортантные штаммы вирусов гриппа А, полученные либо из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, Атланта, США), либо из коллекции штаммов отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ»:

1. А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09);
2. А/17/кряква/Нидерланды/00/95 (H7N3) — реассортантный штамм, унаследовавший гены NA и NA от вируса А/кряква/Нидерланды/12/2000 (H7N3), а остальные 6 генов — от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) [4];

3. А/Гонконг/17гг 6:2 PR8 (H7N9) — реассортантный штамм, унаследовавший гены NA и NA от высокопатогенного вируса А/Гонконг/125/2017 (H7N9), а остальные 6 генов — от модельного штамма А/PR/8/34 (H1N1) (PR8). Ген NA был модифицирован путем удаления четырех основных аминокислот из кливд-сайта молекулы для обеспечения низкопатогенного фенотипа;

4. А/Индонезия/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1) — реассортантный штамм, унаследовавший модифицированный ген NA и интактный ген NA от высокопатогенного штамма А/Индонезия/05/05 (H5N1), а остальные 6 генов — от модельного штамма PR8;

5. RN1/09-свиной (H7N1) — реассортантный штамм, содержащий ген NA от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), ген NA от штамма А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09, а остальные 6 генов — от донора аттенуации Лен/17 [2];

6. RN2/57-человек (H7N2) — реассортантный штамм, унаследовавший ген NA от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), а остальные 7 генов — от донора Лен/17 [3];

7. RN2/97-птичий (H7N2) — реассортантный штамм, унаследовавший ген NA от вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), ген NA от штамма А/перепел/Гонконг/G1/97 (H9N2), а остальные 6 генов — от донора аттенуации Лен/17;

8. RN9/13-человек (H6N9) — реассортантный штамм, унаследовавший ген NA от вируса А/серебристая чайка/Сарма/51с/06 (H6N1), ген NA от штамма А/Ануи/1/2013 (H7N9), а остальные 6 генов — от донора аттенуации Лен/17 [5].

Вирусы накапливали в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (ЗАО «Птицефабрика

Синявинская», Ленинградская обл.) при температуре 37°C (для эпидемических вирусов и реассортантных штаммов на основе вируса PR8) или 33°C (для реассортантных штаммов на основе донора Лен/17). Инфекционный титр вирусов в РКЭ определяли методом предельных разведений, для чего эмбрионы заражали 10-кратными разведениями вирусов и инкубировали в течение 48 часов. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [30] и выражали в \log_{10} 50% эмбриональных инфекционных доз (ЭИД₅₀)/мл. Очистку и концентрирование вирусов проводили путем ультрацентрифугирования на 30%/60% градиенте сахарозы.

Поиск линейных В-клеточных эпитопов нейраминидазы вирусов гриппа А. Для поиска консервативных эпитопов NA из базы данных вирусов гриппа Национального центра биотехнологической информации (The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information) был отобран ряд аминокислотных последовательностей нейраминидаз различных вирусов гриппа А (в основном H1N1, H2N2, H3N2, H7N3 и H7N9) [6]. Выравнивание последовательностей производилось при помощи программы UGENE от UniPro (версия 1.31.0) [26]. Существующие на данный момент алгоритмы не способны с большой точностью и чувствительностью предсказывать линейные В-клеточные эпитопы. Поэтому для достижения большей точности в данном исследовании использовались шесть методов с последующим обобщением полученных результатов. Все они реализованы как веб-инструменты и находятся в свободном доступе. Мы применяли следующие методы: VeriPred [23], ElliPro [28], ABCPred [32], EpiToPIA [31], AAPPred [9, 11], COVEpro [36].

Пептидный синтез и подготовка антигена для иммунизации. Пептиды, соответствующие линейным В-клеточным эпитопам NA, были химически синтезированы твердофазным методом (SPPS) [17]. Использовался твердый носитель — 2-хлортритильная смола (Iris Biotech, Германия). Последовательность пептидов наращивалась вручную. N-концевая α -аминогруппа была защищена временной Fmoc-группой (стратегия 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)/трет-бутил (tBu) [Iris Biotech, Германия]). Активация α -аминогруппы *in situ* происходила с использованием 1,3-диизопропилкарбодиимида (Iris Biotech, Германия) в N,N-диметилформамиде (Вектон, Россия). Временную защиту Fmoc удаляли с помощью основного 20%-ного 4-метилпиперидина (Вектон, Россия), растворенного в N,N-диметилформамиде, и постоянную защиту трет-бутила и боковой цепи трет-бутилоксикарбонила (Iris Biotech, Германия) с помощью трифторуксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США) и H₂O/триизопропилсилана

(Sigma-Aldrich, США)/1,2-этандитиола (Sigma-Aldrich, США) во время отделения от твердой подложки. Очистку пептидов осуществляли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), после чего образцы высушивали путем центрифугирования под вакуумом на установке SpeedVac (Savant, США). Чистота полученных пептидов составляла не менее 95%, что было подтверждено аналитическим электрофорезом, аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрическим анализом (МАЛДИ; кроме того, была подтверждена идентичность). Масс-спектры пеп-

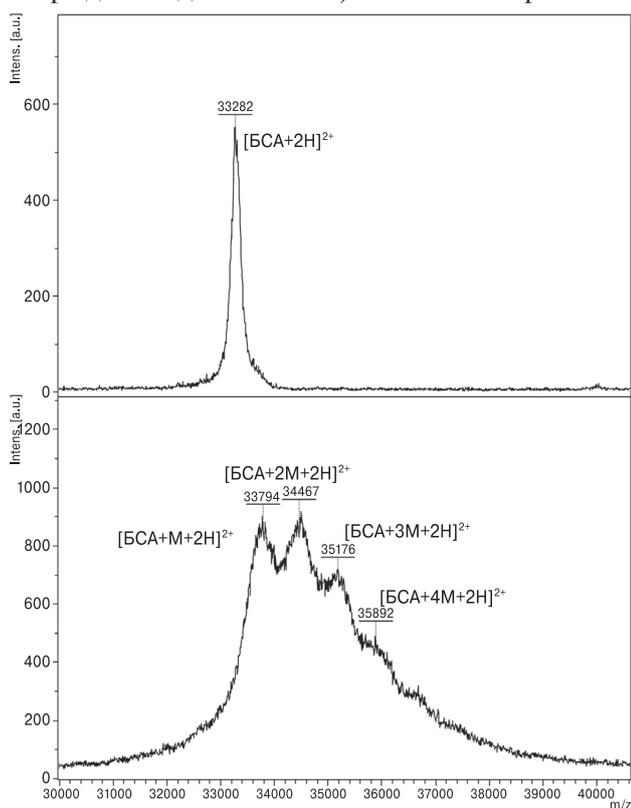


Рисунок 1. Масс-спектры БСА (молекулярная масса — 66 431 Da, верхний масс-спектр) и его конъюгатов с пептидом MNPNQIITIGS (M, моноизотопная молекулярная масса 1314,7 Da, нижний масс-спектр). Показан участок спектра, содержащий сигналы двухзарядных ионов, в том числе ионов конъюгатов БСА с одной или несколькими молекулами. Точность измерения масс в этой области спектра составляет ± 100 – 200 Da

Figure 1. Mass spectrometry of BSA (molecular weight 66 431 Da, upper mass spectrum) and its conjugates with the peptide MNPNQIITIGS (M, monoisotopic molecular weight 1314.7 Da, lower mass spectrum). A spectral section containing signals of doubly charged ions, including ions of BSA conjugates with one or more molecules, is shown. The accuracy of mass measurements in this region of the spectrum is ± 100 – 200 Da

тидов регистрировали на приборе Ultraflex extreme (Bruker, Германия) в стандартных условиях: положительные ионы, рефлекторный режим, матрица — 4-гидрокси- α -цианокоричная кислота. Концентрацию пептидов в полученных образцах определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность растворов при длине волны 280 нм (если в состав пептида входили остатки тирозина или триптофана) или при длине волны 214 нм (если в составе молекулы пептида отсутствовали остатки данных ароматических аминокислот), а затем рассчитывая их концентрацию с помощью вычисленных на основе аминокислотного состава пептидов коэффициентов молярной экстинкции [27].

Пептиды конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА) (Sigma-Aldrich, США) для дальнейшей иммунизации экспериментальных животных. В качестве конъюгирующего реагента был использован глутаровый альдегид (ООО «БИО», Россия). Чтобы конъюгация с применением данной методики была возможна, в состав аминокислотной последовательности каждого пептида включали остаток лизина на С-конце молекулы. Для получения конъюгата к 1 мг пептида добавляли 0,5 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (НФБ), pH 7,0. К полученному раствору добавляли 5 мг БСА, предварительно разведенного в 0,5 мл 0,1 М НФБ. К полученной смеси добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,02%-ного глутарового альдегида в 0,1 М НФБ. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем проводили диализ против деионизированной воды в течение 24 ч при 4°C. Концентрацию белка в конъюгате определяли по методу Брэдфорда [7]. Образование конъюгатов контролировали методом масс-спектрометрии МАЛДИ, используя линейный режим масс-анализа. Пример показан на рис. 1.

Оценка иммуногенности и защитной эффективности NA пептидов для мышей. Экспериментальная работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [1] и была одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (протокол №3/17 от 30.11.2017). В работе использовались самки мышей линии СВА (питомник «Рапполово», Ленинградская область), по 14 животных в группе. Мышей иммунизировали интраперитонеально смесью из трех пептидов (MNPNQIITIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP), конъюгированных с БСА, в концентрации 15 мкг/мл трехкратно с интервалом 2 недели. Для усиления иммуногенности смеси применялся неполный адъювант Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 2:1. Мышам контрольной группы вводили стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS, ООО «Биолот»). Забор крови у иммунизированных

мышей проводили через 2 недели после третьей иммунизации, после чего животных делили на 2 группы и заражали интраназально вирулентными вирусами А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) или А/Гонконг/17г 6:2 PR8 (H7N9), взятыми в дозе 1 LD₅₀ (50%-ная летальная доза) в объеме 50 мкл. Выживаемость и потерю веса у зараженных мышей оценивали ежедневно в течение 10 дней. Забор легких у мышей производили на 4-й и 8-й день после заражения и хранили замороженными при -70°C. Гомогенаты тканей легких готовили с использованием гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия) в 1 мл стерильного PBS, содержащего антибиотик-антимикотик (Invitrogen, Великобритания). Гомогенаты осветляли низкоскоростным центрифугированием при 6000 об/мин в течение 5 мин. Полученные супернатанты использовали для определения титров вирусов в РКЭ по описанной выше схеме.

Иммуногенность NA-пептидов оценивали по содержанию вирус-специфических IgG-антител в сыворотках крови иммунизированных мышей. Для разрушения термолабильных ингибиторов гемагглютинации сыворотки прогревались при 56°C в течение 30 мин. Для удаления NA-чувствительных ингибиторов гемагглютинации один объем цельной сыворотки инкубировался 18–20 ч при 37°C в присутствии 3 объемов экстракта нейраминидазы холерных вибрионов (RDE, Denka Seiken Co., Ltd, Япония), с последующей инактивацией фермента прогреванием проб при 56°C в течение 1 ч. После этого к пробам добавляли 6 объемов стерильного PBS (то есть разведение исходной сыворотки составляло 1:10).

Постановка иммуноферментного анализа (ИФА) проводилась согласно опубликованной ранее методике [12], но с некоторыми изменениями. Планшеты (Sarstedt, Германия) покрывали различными вирусами гриппа А, разведенными в PBS до 20 агглютинирующих единиц (АЕ). В качестве блокирующего буфера использовали 1%-ный овальбумин. Использовались козы анти-мышинные IgG-антитела (Sigma-Aldrich, США), меченые пероксидазой хрена, в разведении 1/20 000. Проявление пероксидазной реакции проводилось с добавлением 100 мкл ТМВ-субстрата (BD Biosciences, США). Ферментативную реакцию останавливали 100 мкл 1 Н серной кислоты, после чего оптическую плотность считывали на спектрофотометре при длине волны 450 нм. За титр сыворотки принимали наивысшее разведение образца, дающее оптическую плотность при длине волны 450 нм, превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

Статистическая обработка результатов. Анализ данных проводили с использовани-

ем программ Statistica 10 и GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США). Статистическую значимость различий между группами иммунизированных и контрольных мышей определяли либо при помощи непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (титры антител в сыворотках крови и титры вирусов в легких мышей), либо при помощи критерия Мантела–Кокса (выживаемость мышей после заражения). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Консервативные линейные В-клеточные эпитопы. Используя методы по предсказанию В-клеточных эпитопов и проанализировав последовательности нейраминидаз различных вирусов гриппа А, мы обнаружили 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы (рис. 2, II обложка):

1. MNPNQKI (1–7);
2. MNPNQKIITIGS (1–12);
3. ILRTQESEC (222–230);
4. DNWKGSNRP (293–301);
5. SGYSG (404–408);
6. SWPDG (457–461);
7. EECSCYP (276–282);
8. VELIRGR (424–430).

В скобках указан порядковый номер аминокислот по нумерации N2.

Для последующей работы были выбраны 3 эпитопа — MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP. Они были синтезированы *de novo*, конъюгированы с БСА и далее использовались для иммунизации мышей.

Иммуногенность NA-пептидов. Титр сывороточных IgG-антител определяли для ряда различных цельных вирусов гриппа, представляющих разные подтипы NA (N1, N2, N3 и N9). Было показано, что антитела из сывороток крови СВА-мышей, иммунизированных смесью трех пептидов, были способны реагировать с различными антигенами (рис. 3). Так, среднегеометрические титры антител (СГТ) ко всем исследованным вирусам гриппа были достоверно выше у вакцинированных мышей, чем у животных контрольной группы.

Защитная эффективность NA-пептидов. Для определения способности NA-специфичных антител обеспечивать защиту против различных подтипов вируса гриппа А, иммунизированных мышей заражали двумя вирулентными вирусами гриппа: H1N1 и H7N9. Несмотря на то что иммунизация NA-пептидами не защитила мышей от существенной потери веса после инфицирования вирусом H1N1, все иммунизированные мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как в контрольной группе выживаемость составила только 28,6% ($p = 0,013$)

(рис. 4А, Б). Анализ вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных вирусом H1N1, не выявил различий в титрах ни на 4-е, ни на 8-е сутки после заражения ($p > 0,05$), однако в группе иммунизированных мышей у трех из пяти животных вирус полностью элиминировался к 8-м суткам, тогда как в контрольной группе вирус продолжал размножаться у 100% мышей на 8-й день после заражения (рис. 4В).

Иммунизация смесью NA-пептидов, которая обеспечивала защиту от вируса H1N1, не оказывала

протективного эффекта при заражении летальным вирусом H7N9: уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы у иммунизированных мышей и мышей контрольной группы ($p > 0,05$) (рис. 4А–В). Эти данные указывают на то, что уровни анти-N9-антител, индуцированные иммунизацией смесью исследуемых NA-пептидов, являются недостаточными для защиты мышей от клинических проявлений инфекции, вызванной вирусом H7N9.

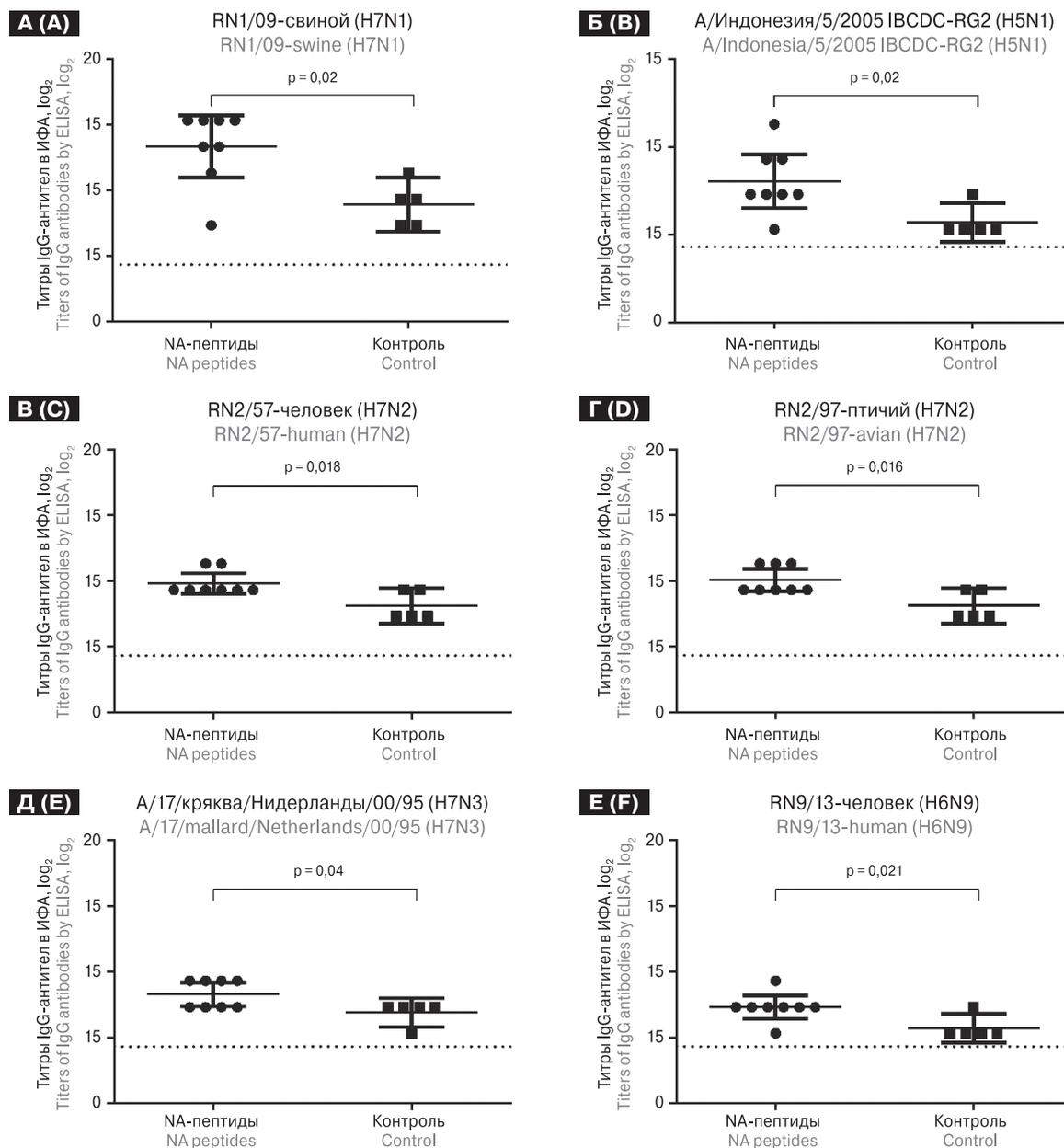


Рисунок 3. Иммуногенность смеси из трех NA-пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Указаны цельновирионные антигены, использованные в ИФА и содержащие подтипы нейраминидазы N1 (А, Б), N2 (В, Г), N3 (Д) и N9 (Е). Указаны индивидуальные значения титров сывороток иммунизированных и контрольных мышей, а также среднегеометрические титры с 95%-ным интервалом

Figure 3. Immunogenicity of a mixture of three NA peptides in CBA mice. A whole virus antigens N1 (A, B), N2 (C, D), N3 (E) and N9 (F) neuraminidase subtypes used in ELISA are indicated. The individual serum titers from immunized and control mice are indicated, as well as the geometric mean titers with a 95% interval

Обсуждение

На сегодняшний день основным способом борьбы с гриппом является активная иммунопрофилактика населения с помощью специфических вакцин. Необходимость того, что все гриппозные вакцины, как живые, так и инактивированные, должны оцениваться на соответствие и эффективность по двум антигенам — гемагглютинуину и нейраминидазе, обсуждалась еще в 1970-х гг. [13]. Несмотря на это, до сих

пор все инактивированные вакцины стандартизируются по содержанию НА, а количество НА в вакцине различается у разных производителей [10, 19]. Однако основным недостатком современных вакцин против гриппа является высокая степень антигенной изменчивости НА, что приводит к необходимости актуализировать вакцинный штамм практически ежегодно. В отличие от НА, NA подвергается гораздо более медленному антигенному дрейфу, а некоторые консервативные участки NA почти не изменя-

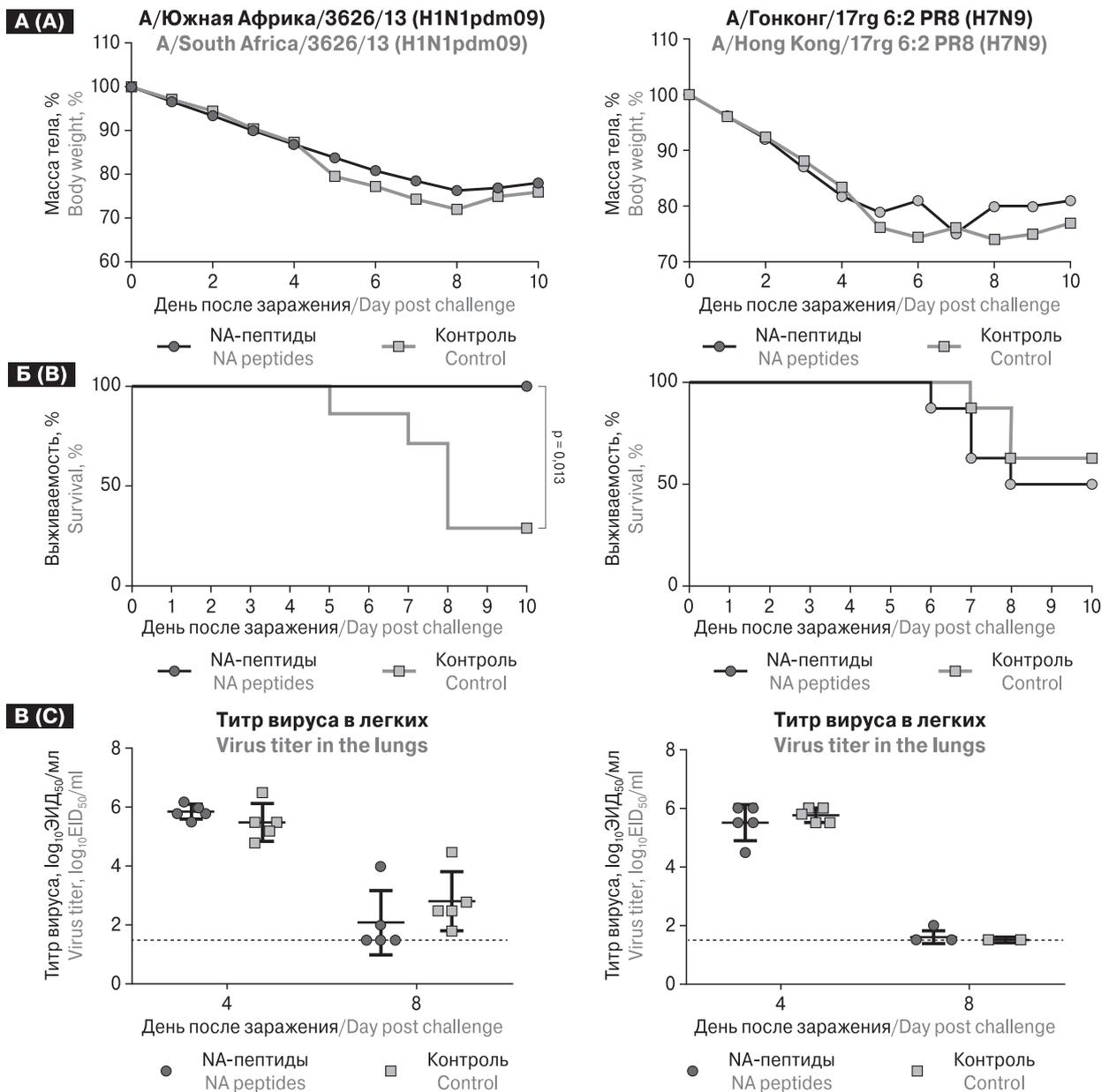


Рисунок 4. Защитная эффективность смеси из трех NA-пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Оценку защитного эффекта вакцинации проводили по анализу потери веса животных (А), выживаемости (Б) и титрам вирусов в легких мышей на 4-е и 8-е сутки после заражения (В). Пунктирная линия указывает на уровень детекции вируса в гомогенатах тканей легких мышей

Figure 4. Protective efficacy of a mixture of three NA peptides in CBA mice. The protective vaccination-related effect was assessed by monitoring animal body weight loss (A), survival rate (B), and lung virus titer from mice on day 4 and 8 after challenge (C). Dashed line denotes the limit of virus detection in the lung homogenates

ются в процессе эволюции [37]. В связи с этим NA рассматривается как перспективный антиген для разработки гриппозных вакцин широкого спектра действия [22]. С одной стороны, улучшить эффективность вакцинации можно за счет регламентирования минимального содержания NA в противогриппозных вакцинах [10, 16]. С другой стороны, консервативные эпитопы NA можно использовать при конструировании универсальной гриппозной вакцины [18, 20], а также в качестве дополнительного компонента к уже имеющимся вакцинам [34, 38]. В последние годы ведется активная работа по поиску моноклональных антител к ферментативному сайту NA, обладающих широкой кросс-реактивностью в отношении вирусов гриппа А различных подтипов, а также вирусов гриппа типа В [35]. Однако в подавляющем большинстве случаев эпитопы для таких антител являются пространственными, то есть составляющие их аминокислоты расположены в различных участках белка и только в результате его фолдинга оказываются сближены. Очевидно, что такие эпитопы не могут быть использованы для конструирования универсальных гриппозных вакцин на имеющихся вакцинных платформах. Именно поэтому в настоящем исследовании мы сконцентрировались на поиске линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных для различных вирусов гриппа А.

В 2013 г. Т. Дойл с соавт. [14] определили один консервативный для всех подтипов вируса гриппа А линейный В-клеточный эпитоп NA, иммунизация которым давала защиту от вирусов гриппа со всеми подтипами NA *in vitro* и частичную защиту *in vivo*. В нашем исследовании с помощью методов биоинформатики было выявлено наличие 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра NA. Локализация выявленных эпитопов вблизи активного центра NA виру-

сов гриппа различных подтипов говорит о том, что эти участки NA являются функционально значимыми и могут рассматриваться как перспективные мишени для создания гриппозных вакцин широкого спектра действия. На начальном этапе для пептидного синтеза и последующей иммунизации мышей были выбраны три выявленных эпитопа NA: MNPNQKIITIGS [19], ILRTQESEC [14] и DNWKGSNRP [21]. Мы использовали их в качестве смеси для иммунизации экспериментальных животных, чего до настоящего времени никто не делал. Смесь трех пептидов, соответствующих отобранным эпитопам NA, при внутрибрюшинном введении вызывала образование у мышей сывороточных антител, связывающихся с цельными вирусами гриппа различных подтипов NA (N1, N2, N3 и N9), что указывает на иммуногенность и кросс-реактивность NA-пептидов. Полученные в настоящем исследовании данные показали способность индуцированных анти-NA-антител защищать мышей от летального исхода, вызванного вирусом H1N1, но при этом животные не были защищены от гибели, обусловленной вирусом H7N9. Эти результаты, с одной стороны, показали перспективность использования линейных В-клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных вакцин нового поколения: так, в частности, можно использовать живую гриппозную вакцину в качестве вектора, где линейные эпитопы NA могут быть встроены в молекулу гемагглютинаина, что существенно повысит их содержание в вирионе и, как следствие, их иммуногенность. С другой стороны, полученные данные указывают на необходимость более глубокого и полного исследования специфичности консервативных эпитопов NA, а также оптимизации схем иммунизации для достижения более высоких показателей защитной эффективности, что будет сделано в будущем.

Список литературы/References

1. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г. [Measures to further improve organizational forms of work using experimental animals: Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 08/12/1977 (In Russ.)] URL: <https://docplayer.ru/31723947-Ministerstvo-zdravoohraneniya-sssr-prikaz-12-avgusta-1977-g-n-755.html> (20.11.2020)
2. Патент № 2428476С Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01). Реассортантный штамм вируса гриппа RN 1/09-Swine A(H7N1) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации: № 2010125452/10; заявлено 2010.06.21; опубликовано 2011.09.10 / Дешева Ю.А., Смологодина Т.С., Руденко Л.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В. Патентообладатель: НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН. 8 с. [Patent No. 2428476C Russian Federation, Int. Cl C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01). Reassortant strain of influenza virus RN1/09-Swine A(H7N1) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. No. 2010125452/10; application: 2010.06.21; date of publication 2011.09.10 / Desheva Y.A., Smolodogina T.S., Rudenko L.G., Kiseleva I.V., Larionova N.V. Proprietors: Nauchno-issledovatel'skij institut ehksperimental'noj meditsiny Severo-Zapadnogo otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 8 p.]
3. Патент № 2464312C1 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), C12R 1/93 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Реассортантный штамм вируса гриппа RN2/57-Human A(H7N2) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации: № 2011124663/10; заявлено 2011.06.16; опубликовано 2012.10.20 / Дешева Ю.А., Смологодина Т.С., Руденко Л.Г. Патентообладатель: ФГБУ НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного

- отделения РАМН. 8 с. [Patent No. 2464312C1 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01), C12R 1/93 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Reassortant strain of influenza virus RN2/57-Human A(H7N2) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. No. 2011124663/10; application: 2011.06.16: date of publication 2012.10.20 / Desheva Y.A., Smolonogina T.S., Rudenko L.G. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie Nauchno-issledovatel'skij institut eksperimental'noj meditsiny Severo-Zapadnogo otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 8 p.]
4. Патент № 2507256C2 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01), A61P 31/00 (2006.01). Штамм вируса гриппа A/17/mallard/Нидерланды/00/95(H7N3) для производства живой и производства инактивированной гриппозных вакцин: № 2012108866/10; заявлено 2012.03.07: опубликовано 2013.09.20 / Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Патентообладатель: ФГБУ НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН. 8 с. [Patent No. 2507256C2 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01), A61P 31/00 (2006.01). The strain of influenza virus A/17 /mallard/Netherlands/00/95 (H7N3) for the production of live and production of inactivated influenza vaccines. No. 2012108866/10; application: 2012.03.07: date of publication 2013.09.20 / Desheva Y.A., Rudenko L.G., Alexandrova G.I. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie Nauchno-issledovatel'skij institute eksperimentalnoj meditsiny Severo-Zapadnogo otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 8 p.]
 5. Патент № 2587629C1 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), C12Q 1/00 (2006.01). Реассортантный штамм вируса гриппа RN9/13-Human A(H6N9) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации: № 2014154110/10; заявлено 2014.12.29: опубликовано 2016.06.20 / Смолоногоина Т.С., Дешева Ю.А. Патентообладатель: ФГБНУ Институт экспериментальной медицины. 11 с. [Patent No. 2587629C1 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01), C12Q 1/00 (2006.01). Reassortant strain of influenza virus RN9/13-Human A(H6N9) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. No. 2014154110/10; application: 2014.12.29: date of publication 2016.06.20 / Smolonogina T.S., Desheva Y.A. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe nauchnoe uchrezhdenie Institut eksperimentalnoj meditsiny. 11 p.]
 6. Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., Ostell J., Lipman D. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 2, pp. 596–601. doi: 10.1128/JVI.02005-07
 7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
 8. Bui C., Bethmont A., Chughtai A.A., Gardner L., Sarkar S., Hassan S., Seale H., MacIntyre C.R. A systematic review of the comparative epidemiology of avian and human influenza A H5N1 and H7N9 — lessons and unanswered questions. *Transbound Emerg. Dis.*, 2016, vol. 63, no. 6, pp. 602–620. doi: 10.1111/tbed.12327
 9. Chen J., Liu H., Yang J., Chou K.C. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 2007, vol. 33, no. 3, pp. 423–428. doi: 10.1007/s00726-006-0485-9
 10. Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., Lee J., Wan H., Rojas K.T., Kirkpatrick E., Henry C., Palm A.E., Stamper C.T., Lan L.Y., Topham D.J., Treanor J., Wrammert J., Ahmed R., Eichelberger M.C., Georgiou G., Krammer F., Wilson P.C. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies. *Cell*, 2018, vol. 173, no. 2, pp. 417–429. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.030
 11. Davydov Y.I., Tonevitsky A. Prediction of linear B-cell epitopes. *Mol. Biol.*, 2009, vol. 43, no. 1, pp. 150–158. doi: 10.1134/S0026893309010208
 12. Desheva J.A., Lu X.H., Rekstin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Klimov A.I. Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential. *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 47–48, pp. 6859–6866. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.023
 13. Dowdle W.R. Influenza anti-neuraminidase: the second best antibody. *N. Engl. J. Med.*, 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1360–1361. doi: 10.1056/NEJM197206222862511
 14. Doyle T.M., Hashem A.M., Li C., Van Domselaar G., Larocque L., Wang J., Smith D., Cyr T., Farnsworth A., He R., Hurt A.C., Brown E.G., Li X. Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 567–574. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.018
 15. Eichelberger M.C., Monto A.S. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine target for broadened protection. *J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 219, suppl. 1, pp. 75–80. doi: 10.1093/infdis/jiz017
 16. Eichelberger M.C., Morens D.M., Taubenberger J.K. Neuraminidase as an influenza vaccine antigen: a low hanging fruit, ready for picking to improve vaccine effectiveness. *Curr. Opin. Immunol.*, 2018, vol. 53, pp. 38–44. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.025
 17. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Ed. by W.C. Chan, P.D. White. *Oxford: Oxford University Press*, 2000. 346 p.
 18. Gottlieb T., Ben-Yedidia T. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. *J. Autoimmun.*, 2014, vol. 54, pp. 15–20. doi: 10.1016/j.jaut.2014.07.005
 19. Gravel C., Li C., Wang J., Hashem A.M., Jaentschke B., Xu K.W., Lorbetskie B., Gingras G., Aubin Y., Domselaar G.V., Girard M., He R., Li X. Qualitative and quantitative analyses of virtually all subtypes of influenza A and B viral neuraminidases using antibodies targeting the universally conserved sequences. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 36, pp. 5774–5784. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.075
 20. Herrera-Rodriguez J., Meijerhof T., Niesters H.G., Stjernholm G., Hovden A.O., Sørensen B., Ökvist M., Sommerfelt M.A., Huckriede A. A novel peptide-based vaccine candidate with protective efficacy against influenza A in a mouse model. *Virology*, 2018, vol. 515, pp. 21–28. doi: 10.1016/j.virol.2017.11.018
 21. Huang P., Xu Y., Ni H., Zhong J., Zhang X., Tan S., Wu D., Qiu B., Guan D., Wen M., Yan J., Zhang Y. Linear B-cell epitope mapping of neuraminidases of the 2009 A H1N1 viruses based on immunoinformatics. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 6, pp. 1278–1282. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.11.080
 22. Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., Wilson P.C., Compans R.W., Skountzou I., Monto A.S. NAction! How can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines? *mBio*, 2018, vol. 9, no. 2: e02332-17. doi: 10.1128/mBio.02332-17
 23. Larsen J.E., Lund O., Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.*, 2006, vol. 2: 2. doi: 10.1186/1745-7580-2-2

24. Murphy B.R., Kasel J.A., Chanock R.M. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N. Engl. J. Med.*, 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1329–1332. doi: 10.1056/NEJM197206222862502
25. Nichol K.L. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. *Vaccine*, 2008, vol. 26, suppl. 4, pp. 17–22. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.048
26. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
27. Pace C.N. Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. *Methods Enzymol.*, 1995, vol. 259, pp. 538–554. doi: 10.1016/0076-6879(95)59060-9
28. Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Füsseder N., Bourne P.E., Sette A., Peters B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9: 514. doi: 10.1186/1471-2105-9-514
29. Quan F.S., Kim M.C., Lee B.J., Song J.M., Compans R.W., Kang S.M. Influenza M1 VLPs containing neuraminidase induce heterosubtypic cross-protection. *Virology*, 2012, vol. 430, no. 2, pp. 127–135. doi: 10.1016/j.virol.2012.05.006
30. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, no.3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
31. Rubinstein N.D., Mayrose I., Martz E., Pupko T. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics*, 2009, vol. 10: 287. doi: 10.1186/1471-2105-10-287
32. Saha S., Raghava G.P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 2006, vol. 65, no. 1, pp. 40–48. doi: 10.1002/prot.21078
33. Schulman J.L., Khakpour M., Kilbourne E.D. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *J. Virol.*, 1968, vol. 2, no. 8, pp. 778–786. doi: 10.1128/JVI.2.8.778-786.1968
34. Soema P.C., Rosendahl Huber S.K., Willems G.J., Jacobi R., Hendriks M., Soethout E., Jiskoot W., de Jonge J., van Beek J., Kersten G.F.A., Amorij J.P. Whole-inactivated influenza virus is a potent adjuvant for influenza peptides containing CD8(+) T cell epitopes. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 525. doi: 10.3389/fimmu.2018.00525
35. Stadlbauer D., Zhu X., McMahon M., Turner J.S., Wohlbold T.J., Schmitz A.J., Strohmeier S., Yu W., Nachbagauer R., Mudd P.A., Wilson I.A., Ellebedy A.H., Krammer F. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase. *Science*, 2019, vol. 366, no. 6464, pp. 499–504. doi: 10.1126/science.aay0678
36. Sweredoski M.J., Baldi P. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2009, vol. 22, no. 3, pp. 113–120. doi: 10.1093/protein/gzn075
37. Wohlbold T.J., Krammer F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses*, 2014, vol. 6, no. 6, pp. 2465–2494. doi: 10.3390/v6062465
38. Xiao J., Zhang L., Wang Z., Xiang W., Lu P., Zhao Y., Han M., Ma A., Qi P., Wang M., Gao G.F., Liu W.J. Conserved peptides enhance immune efficiency of inactive vaccines against emerging avian influenza viruses in chicken. *Science China Life Sciences*, 2017, vol. 60, no. 12, pp. 1340–1347. doi: 10.1007/s11427-017-9153-2

Авторы:

Сычев И.А., младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Копейкин П.М., младший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Цветкова Е.В., к.б.н., доцент кафедры биохимии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Чередова К.В., лаборант-исследователь отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Мильман Б.Л., д.х.н., зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Шамова О.В., д.б.н., доцент, зав. отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Исакова-Сивак И.Н., д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Дешева Ю.А., д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sychev I.A., Junior Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Kopeikin P.M., Junior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Tsvetkova E.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Cheredova K.V., Investigator (Biologist), Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Milman B.L., PhD, MD (Chemistry), Head of the Laboratory for Mass Spectrometry, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Shamova O.V., PhD, MD (Biology), Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Isakova-Sivak I.N., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Diseases, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Desheva Y.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.12.2019
Отправлена на доработку 13.02.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 12.12.2019
Revision received 13.02.2020
Accepted 11.03.2020

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, А.Э. Эргешов, В.В. Еремеев

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. Протекция при туберкулезной инфекции во многом определяется способностью тканевых макрофагов организма хозяина ограничивать рост и распространение микобактерий. Способные к размножению внутри макрофагов хозяина микобактерии выработали ряд защитных механизмов, препятствующих слиянию фагосом с лизосомами, избегая тем самым разрушительного воздействия лизосомальных ферментов. Сапозины представляют собой небольшие, кислые, термостабильные, не обладающие ферментативной активностью гликолипопротеины, участвующие в качестве кофакторов в процессах деградации гликофинголипидов с короткими олигосахаридными головными группами. Сапозины А, В, С и D образуются в кислых эндосомах в результате расщепления исходной молекулы просапозина. Влияние сапозина D на иммунный ответ человека на микобактериальную инфекцию обусловлено их участием в процессе презентации антигенов микобактерий на молекулах CD1. В предварительных исследованиях методом электронной микроскопии нами было обнаружено повреждающее действие сапозина D на мембрану *Mycobacterium tuberculosis* в кислой среде. Эти данные позволили нам предположить, что сапозин D является важным компонентом защиты от туберкулезной инфекции. Цель исследования — изучение влияния дефицита сапозина D на формирование противотуберкулезного иммунного ответа и на способность макрофагов подавлять рост *M. tuberculosis*. **Материалы и методы.** Работу проводили на интерстициальных легочных макрофагах и макрофагах перитонеального экссудата мышей родительской линии C57BL/6 и дефицитной по гену сапозина D линии C57BL/6-SapD^{-/-}. **Результаты.** В результате проведенных исследований было установлено, что макрофаги мышей линии C57BL/6 дикого типа, как интерстициальные легочные, так и перитонеального экссудата, контролируют рост микобактерий *in vitro* значительно более эффективно, чем макрофаги, дефицитные по гену SAPD. Для изучения возможности компенсации дефицита сапозина D в макрофагах перитонеального экссудата мышей C57BL/6-SapD^{-/-} на основе лентивирусного вектора была создана генетическая конструкция, содержащая искусственный ген сапозина D. Заражение дефицитных по гену SAPD перитонеальных макрофагов экспрессионным вектором приводило к компенсации дефицита сапозина D в этих клетках и восстановлению их бактерицидной функции. Механизм действия всех известных на сегодня лекарств объясняется влиянием на различные пути метаболизма микобактерий (ингибирование биосинтеза жирных кислот, арабиногалактана, пептидогликана и биосинтеза белка; ингибирование ДНК-зависимых процессов, протонных насосов и цитохром P450-зависимых монооксигеназ). **Выводы.** Показано, что дефицит сапозина D препятствует активации бактерицидной функции макрофагов *in vitro*. Наше исследование

Адрес для переписки:

Шепелькова Галина Сергеевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2, ФГБНУ Центральный
научно-исследовательский институт туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Contacts:

Galina S. Shepelkova
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza alley, 2,
Central Tuberculosis Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Для цитирования:

Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Эргешов А.Э., Еремеев В.В.
Влияние сапозина D на бактериостатическую функцию макрофагов
при экспериментальной туберкулезной инфекции // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 473–480. doi: 10.15789/2220-7619-
TEO-1386

Citation:

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A., Yermeev V.V. Saposin D
acting on macrophage bacteriostatic function in experimental tuberculosis
infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 473–480. doi: 10.15789/2220-7619-
TEO-1386

может являться предпосылкой биологического обоснования возможности использования генетической конструкции на основе гена природного белка человека, а именно сапозина D, в качестве нового противотуберкулезного препарата.

Ключевые слова: туберкулез, макрофаги, сапозин D, искусственный ген, лентивирус, гликолипопротеин.

SAPOSIN D ACTING ON MACROPHAGE BACTERIOSTATIC FUNCTION IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A., Yeremeev V.V.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. The protection against tuberculosis infection is largely determined by the ability of host tissue macrophages to limit the growth and spread of mycobacteria. Able to multiply within the host macrophages, mycobacteria have developed a number of protective mechanisms preventing phagosome-lysosome fusion, thereby evading damaging effects of lysosomal enzymes. Saposins are small, acidic, thermostable, non-enzymatic glycoproteins that participate as co-factors in degradation of short oligosaccharide head group glycosphingolipids. Saposins A, B, C and D are formed in acidic endosomes due to cleavage of initial prosaposin molecule. The effect of saposins on human immune response is mediated by their involvement in presenting mycobacterial antigens on CD1 molecules. Preliminary studies with electron microscopy allowed to uncover saposin D-bound damaging effect on *Mycobacterium tuberculosis* in acidic environment. These data allowed us to suggest that saposin D is an important protective component fighting against TB infection. The aim of the study was to explore how saposin D deficiency might affect formation of anti-tuberculosis immune response and ability of macrophages to inhibit *M. tuberculosis* growth. **Materials and methods.** Interstitial pulmonary macrophages and peritoneal macrophages were isolated from wild type C57BL/6 strain and saposin D deficient C57BL/6-SapD^{-/-} mouse strains. **Results.** It was found that as compared to macrophages from mice, macrophages from wild type strain significantly better controlled mycobacteria growth *in vitro*. To study an opportunity of compensating for deficient saposin D in peritoneal macrophages from C57BL/6-SapD^{-/-} mice, a saposin D gene-bearing lentiviral vector was created. Transfection of SAPD-deficient peritoneal macrophages with expression vector compensated for saposin D deficiency in such cells and restored bactericidal function. The mechanisms of action for current anti-TB drugs are mediated by various metabolic pathways in mycobacteria (inhibited biosynthesis of fatty acids, arabinogalactan, peptidoglycan and protein; inhibition of DNA-dependent processes, proton pumps and cytochrome P450-dependent monooxygenases). **Conclusion.** It was shown that saposin D deficiency affects activation of macrophage bactericidal function *in vitro*. Our study data may be a prerequisite for biologically substantiated potential of using a vector construct bearing natural human protein gene such as saposin D, as a new anti-tuberculosis drug.

Key words: tuberculosis, macrophages, saposin D, artificial gene, lentivirus, glycolipoprotein.

Введение

Защита организма-хозяина от бактериальной инфекции зависит от двух разных типов ответа — врожденного иммунитета и адаптивного иммунитета [2, 5]. Механизмы, обеспечивающие два этих типа защиты, во многом различны, зависят от активности разных типов клеток и опосредованы разными метаболическими путями. Тем не менее для бактерий с внутриклеточным типом паразитирования все многоступенчатые и разнообразные механизмы защиты и патогенеза сходятся в тканевых макрофагах. Такие клетки, с одной стороны, предоставляют патогену место для выживания и размножения, а с другой стороны, осуществляют эффекторные функции и элиминируют бактерии. Это в полной мере относится к такой инфекции, как туберкулез (ТБ). ТБ до сих пор остается одной из ведущих причин смертности в мире среди инфекционных заболеваний [14]. Факторы, способствующие сдерживанию инфекции или

прогрессированию заболевания, изучены недостаточно, что и диктует необходимость исследования клеточных и молекулярных механизмов реакций иммунного ответа. Макрофаги являются ключевыми участниками этого процесса, поддерживающими баланс в зоне воспаления (гранулемы), которые ингибируют репликацию микобактерий и отвечают за контроль развития патологии.

Сапозины — подгруппа гликопротеинов большого семейства сапозин-подобных белков. Сапозины А, В, С и D образуются в кислых эндосомах путем расщепления просапозина [7]. Сапозины опосредуют взаимодействие между водорастворимым ферментом и связанным с мембраной липидным субстратом либо непосредственно активируют фермент. Показано, что сапозины участвуют в процессе презентации антигенов микобактерий на молекулах CD1 [15]. Продемонстрирована способность сапозина D растворять мембраны, содержащие анионные фосфолипиды [15]. Таким об-

разом, сапозин D является важным компонентом в формировании иммунного ответа к ТБ. Однако неясно, как влияет дефицит этого гликопротеина на формирование противотуберкулезного иммунного ответа, на бактериостатическую функцию макрофагов. Наша работа посвящена изучению влияния сапозина D на способность макрофагов мыши подавлять рост *Mycobacterium tuberculosis in vitro*.

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на мышах линий C57BL/6 (B6) и C57BL/6-SapD^{-/-} (SapD-ko), поддерживаемых в питомнике ФГБНУ ЦНИИТ в обычных условиях, с доступом к корму и воде *ad libitum*. Мыши SapD^{-/-} были любезно предоставлены S.H. Kaufmann (Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany) с разрешения Matsuda J. (The Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan) [11]. В работе использовали 10 поколение гибридов возвратного скрещивания мышей линии SapD^{-/-} на основе C57BL/6 (SapD-ko). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с нормами, принятыми в ФГБНУ ЦНИИТ и одобренными этической комиссией.

Микобактериальные культуры. В работе использовали *M. tuberculosis* (штамм H37RV) из коллекции ФГБНУ ЦНИИТ. Для постановки экспериментов *in vitro* использовали микобактерии в фазе логарифмического роста [13]. *M. tuberculosis* пассировали в жидкой среде Дюбо (Difco), содержащей 0,5% БСА (Sigma, США), 2 цикла по 7 дней, переводили культуральную среду для эукариотических клеток и пропускали через фильтр с диаметром пор 5 мкм. Концентрацию микобактерий в полученном фильтрате определяли на третьи сутки путем подсчета микроколоний H37RV в серийных разведениях фильтрата на агаре Дюбо. В течение этого времени исходную суспензию (взвесь) микобактерий хранили при +4°C [10].

Получение суспензии макрофагов. Методики выделения макрофагов отработаны в нашем институте и подробно описаны [3, 10]. Для получения перитонеальных макрофагов клетки перитонеального экссудата выделяли из брюшной полости мышей через 5 дней после внутрибрюшинной инъекции раствора 3%-ного пептона. Обогащение макрофагальных клеток осуществляли адгезией макрофагов на чашках Петри для эукариотических культур клеток. Макрофаги переводили из монослоя в суспензию раствором Версена.

Для выделения интерстициальных легочных макрофагов гомогенат клеток легочной ткани мышей готовили, используя способы, описан-

ные ранее [8]. Гомогенат инкубировали при 37°C в течение 90 мин с 200 ед/мл коллагеназы/мл и 50 ед/мл ДНКазы I (Sigma, США). После инкубирования клетки легкого дважды промывали солевым раствором Хэнкса (HBSS), содержащим 2% FCS и антибиотики. Затем клетки (от 20×10^6 до 30×10^6) инкубировали в 10 мл среды RPMI, содержащей 10% FCS, в течение 1,5 ч в чашках Петри диаметром 100 мм (Costar-Corning, Badhoevedorp, Нидерланды) при 37°C. Неадгезивные клетки удаляли промыванием, а прилипшие клетки отделяли от пластика путем инкубации монослоев в 0,02%-ном растворе без антибиотиков EDTA-PBS в течение 30 мин при 37°C.

Жизнеспособность перитонеальных и легочных макрофагов оценивали по окраске трипановым синим, и, как правило, она составляла более 93%, а содержание неспецифических эстераз-положительных клеток — более 85%.

Жизнеспособность микобактерий в смешанных культурах определяли по избирательному включению 5,6-³H]-урацила [10].

Продукцию ·NO макрофагами (бактериостатическую активность макрофагов) оценивали в супернатантах смешанных культур по концентрации одного из химически стабильных метаболитов азота — нитрит-аниона (NO₂)⁻, с помощью цветной реакции с реактивом Грисса.

Результаты

Для демонстрации влияния дефицита сапозина D на выживание микобактерий в макрофагах интерстициальные легочные макрофаги мышей B6 и SapD-ko культивировали совместно с вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37RV в соотношении «микобактерия—макрофаг» от 1,25:1 до 5:1. Через 72 часа после начала культивирования оценивали жизнеспособность микобактерий в культурах по избирательному включению последними 5,6-³H]-урацила (рис. 1). Как видно на рисунке, макрофаги мышей дикого типа значительно более эффективно контролировали рост *M. tuberculosis*, чем макрофаги мышей, дефицитных по гену SAPD. Особенно четко эти отличия были видны при соотношении в культуре микобактерия: макрофаг 5:1 (рис. 1).

Аналогичные результаты были получены при сокультивировании *in vitro* макрофагов перитонеального экссудата мышей линий B6 и SapD-ko совместно с *M. tuberculosis* при соотношении «бактерия—макрофаг» 5:1 (рис. 2). В данных культурах через 72 часа после начала культивирования оценивали продукцию ·NO макрофагами и жизнеспособность микобактерий.

Активные формы азота (·NO, NO₂, HNO₂) — одни из важнейших эффекторных молекул,

участвующих в антимикобактериальном действии макрофагов. Их продукция макрофагами в значительной степени стимулируется $IFN\gamma$ [4, 9]. В связи с этим представляло интерес исследовать уровень продукции метаболитов азота макрофагами, полученными от мышей дикого типа, и нокауты по сапозину D. Перитонеальные макрофаги мышей B6 и SapD-ko характеризовались схожей незначительной спонтанной секрецией нитрит-аниона, которая не изменялась при добавлении в культуру микобактерий ($1,8\pm 0,4\mu\text{M}$ и $1,3\pm 0,2\mu\text{M}$ соответственно). $IFN\gamma$ в высокой дозе (100 ед/мл) оказывал стимулирующее действие на продукцию нитрит-аниона макрофагами, причем в случае макрофагов, полученных от мышей дикого типа, продукция $\cdot\text{NO}$ была достоверно выше (рис. 2А).

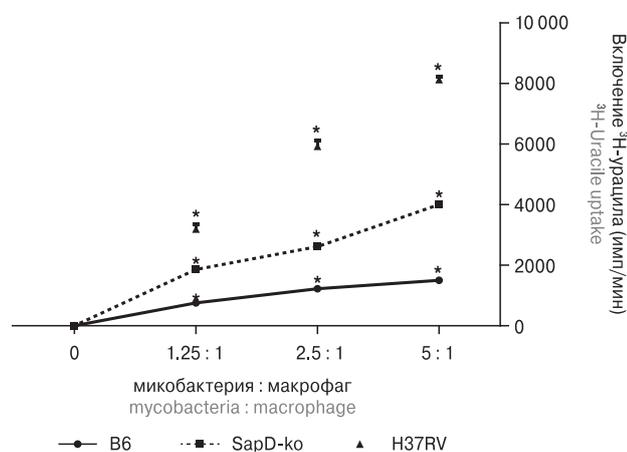


Рисунок 1. Легочные интерстициальные макрофаги мышей SapD-ko значительно уступают макрофагам мышей дикого типа (B6) в способности контролировать рост *M. tuberculosis* при заражении *in vitro* при разных соотношениях «микобактерия–макрофаг» в культуре

Figure 1. Lung interstitial macrophages of SapD-ko mice have significantly lower ability to control the growth of *M. tuberculosis* during *in vitro* infection at different ratios of “microbacteria–macrophage” in culture

Примечания. Макрофаги культивировали в присутствии микобактерий. Через 72 часа в культурах оценивали включение 5,6-[^3H]-урацила. Уровень включения радиоактивной метки служил индикатором метаболической активности микобактерий. На рисунке представлены данные трех независимых экспериментов ($M\pm SD$, $n = 3$ в группе). * — достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

Notes. Macrophages were cultured with mycobacteria. After 72 hours, inclusion of 5,6-[^3H]-uracil was evaluated. The level of 5,6-[^3H]-uracil uptake was used as an indicator of mycobacteria metabolic activity. The data of three independent experiments ($M\pm SD$, $n = 3$ in the group) are presented. * — significant differences between groups ($p < 0.05$).

В тех же культурах оценивали рост микобактерий по избирательному включению последними 5,6-[^3H]-урацила. Было показано, что макрофаги мышей SapD-ko достоверно меньше подавляли рост микобактерий как в присутствии, так и в отсутствии высокой дозы рекомбинантного $IFN\gamma$ (рис. 2Б).

Создание и клонирование искусственного гена сапозина D человека. Для компенсации дефицита сапозина D в макрофагах перитонеального экссудата мышей SapD-ko использовали генетическую конструкцию на основе лентивирусного вектора, содержащую искусственный ген сапозина D. В силу высокой степени гомологии аминокислотной последовательности сапозина D у человека и мыши в работе использовали искусственный ген сапозина D человека.

Для получения искусственного гена сапозина D человека участок гена просапозина, содержащий 5'-нетранслируемую область и сигнальный пептид (205 пар нуклеотидов), получали методом амплификации суммарной человеческой ДНК, выделенной из цельной крови здорового донора. Продукт амплификации (205 пар нуклеотидов) очищали и гидролизовали рестриктазами EcoRI и StuI. Нуклеотидную последовательность, содержащую участок мРНК, кодирующей сапозин D, 3'-нетранслируемую область и сигнал полиаденилирования (1606 пар нуклеотидов), получали методом ПЦР кДНК легочной ткани человека с помощью праймерной пары (sapHincII F: TTATTAGTCGACGGTCA GCCCTGAGCTGGTGTGCAGCATsapDr: ATTA TTGAATTCTAACATTAGGCCAGATCTGGCT AACAGAATTTTATTGTAAATCACAGA).

Продукт, полученный в результате амплификации (1606 пар нуклеотидов), гидролизовали рестриктазами EcoRI и HincII. Затем участки искусственного гена сапозина D человека (фрагменты ДНК размером 205 пар нуклеотидов и 1606 пар нуклеотидов) лигировали с модифицированным вектором pLenti6m, гидролизованным рестриктазой EcoRI (рис. 3).

Плазмидную ДНК (состоящую из лентивирусного вектора, содержащего искусственный ген сапозина D человека, плазмиды, кодирующей структурные белки вируса иммунодефицита человека первого типа, и плазмиды, кодирующей G-белок вируса везикулярного стоматита в соотношении 4:3:1 соответственно) инкубировали совместно с реагентом для трансфекции (Turbofect, Thermo Fisher Scientific, США) в бессывороточной среде, затем смесь равномерно наносили на монослой (до 80%) клеток-упаковщиков линии HEK293 в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки культивировали 24 часа, после чего в течение последующих двух суток отбирали среду с содержащимися в ней

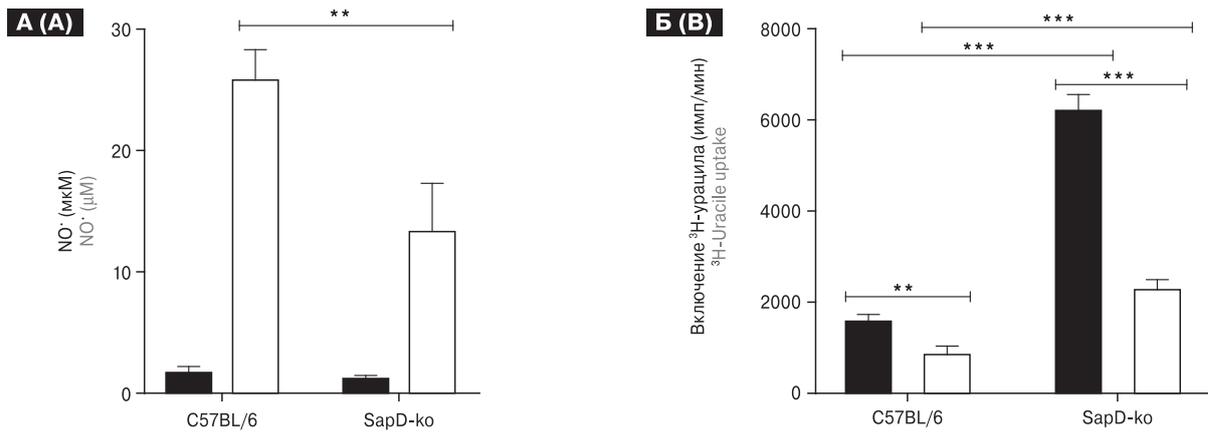


Рисунок 2. Подавление роста микобактерий перитонеальными макрофагами мышей линий В6 и SapD-ko

Figure 2. Mycobacteria's growth inhibition by B6 and SapD-ko peritoneal macrophages

Примечания. Макрофаги перитонеального экссудата культивировали в присутствии микобактерий (■), а также микобактерий и IFN γ (□). Через 72 часа в культурах оценивали количества (NO₂)⁻ (А) и включение ³H-урацила (Б). Включение 5,6- [³H]-урацила микобактериями в отсутствие макрофагов [(5Rv) 7850±180 имп./мин]. На рисунке представлены данные трех независимых экспериментов (M±SD, n = 3 в группе).

Notes. Peritoneal macrophages were cultured with mycobacteria only (■) or with mycobacteria and IFN γ (□). After 72 h of incubation (NO₂)⁻ (A) and ³H-Uracil uptake was quantified (B). 5,6- [³H]-Uracil uptake by mycobacteria without macrophages [(5Rv) 7850±180 cpm]. The data of three independent experiments (M±SD, n = 3 in the group) are presented.

вирусными частицами с интервалом в 12 часов. В качестве положительного контроля трансфекции использовали плазмиду pLenti6m, содержащую GFP. Среду, содержащую вирусные частицы, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Далее фильтрат концентрировали ультрацентрифугированием для использова-

ния в эксперименте *in vitro*. Вирус-содержащий сконцентрированный супернатант клеток-упаковщиков оттитровывали на эмбриональных фибробластах от SapD-ko мышей. Экспрессию сапозина D оценивали путем внутриклеточного окрашивания моноклональными антителами с последующим анализом на проточном ци-

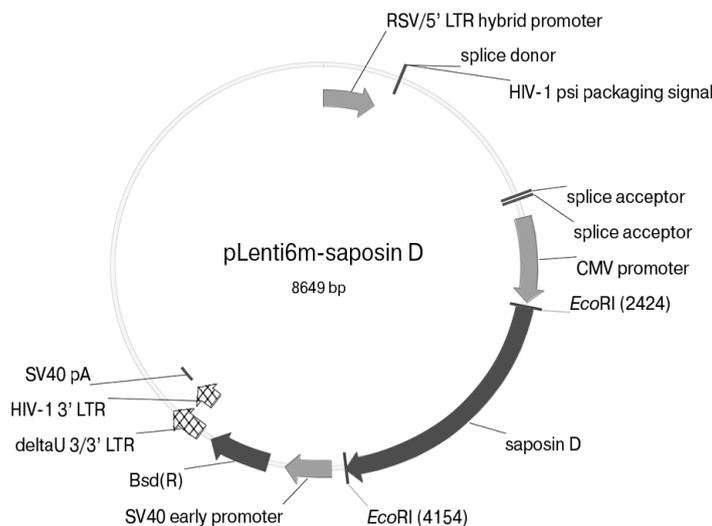


Рисунок 3. Схема лентивирусного вектора pLenti6m saposinD

Figure 3. The lentiviral vector pLenti6m saposinD scheme

RSV/5' LTR hybrid promoter — эукариотический гибридный промотор вируса саркомы Рауса и длинного концевой повтора ВИЧ (вируса иммунодефицита человека); splice donor — донор сплайсинга; splice acceptor — акцептор сплайсинга; HIV-1 psi packaging signal — ψ сигнал упаковки; CMV promoter — цитомегаловирусный промотор; EcoRI — сайт узнавания рестриктазой EcoRI; saposin D — искусственный ген сапозина D человека; SV40 early promoter — ранний промотор SV40; Bsd (R) — ген устойчивости к бластицидину; deltaU 3'/3' LTR — место делеции 3'-области длинного концевой повтора; HIV-1 3' LTR — 3' длинный концевой повтор ВИЧ-1; SV40 pA — сигнал полиаденилирования вируса SV40.

тофлуориметре. Рабочее разведение сконцентрированного раствора вирусных частиц с искусственным геном сапозина D человека определяли титрованием.

Макрофаги перитонеального экссудата мышей SapD-ko инфицировали различными разведениями сконцентрированного раствора вирусных частиц с искусственным геном сапозина D человека (рис. 4). После инфицирования макрофаги культивировали *in vitro* 7 дней, затем промывали средой RPMI, содержащей 2% FCS, и культивировали в присутствии *M. tuberculosis*. Соотношение «микобактерия–макрофаг» в культурах составляло 5:1. Через 72 часа после начала культивирования клеток оценивали жизнеспособность микобактерий по избирательному включению последними 5,6-³H-урацила и продукцию макрофагами \cdot NO [3]. В качестве положительного контроля использовали культуры зараженных *M. tuberculosis* макрофагов, к которым добавляли рекомбинантный IFN γ .

Изменение антимикобактериальной активности зараженных макрофагов было зафиксировано при инфицировании культуры клеток различными разведениями сконцентрированного лентивируса (рис. 4). Так, наибольшей бактерицидной активностью, сопоставимой с таковой в макрофагах мышей дикого типа, об-

ладали клетки, с искусственным геном сапозина D человека, инфицированные лентивирусом в десятикратном разведении (рис. 4). Снижение концентрации лентивируса в культуре макрофагов приводило к уменьшению антимикобактериальной активности фагоцитов (рис. 4А, Б).

Обсуждение

Этиологическим фактором туберкулеза является сложно организованный внутриклеточный бактериальный патоген — *M. tuberculosis*, способный длительное время выживать в организме хозяина, модифицируя его протективный иммунный ответ. Успешность этой стратегии подчеркивается тем фактом, что на сегодняшний день около 2 млрд человек на Земле инфицированы микобактериями [14]. В латентном периоде микобактерии длительное время персистируют в дормантном состоянии без видимого вреда для хозяина и без передачи инфекции окружающим. Однако при нарушении равновесия между «паразитом» и иммунной системой хозяина *M. tuberculosis* переходит в метаболически активное состояние, начинает реплицироваться, его численность нарастает до нескольких миллиардов, что приводит к разрушению тканей хозяина и распространению

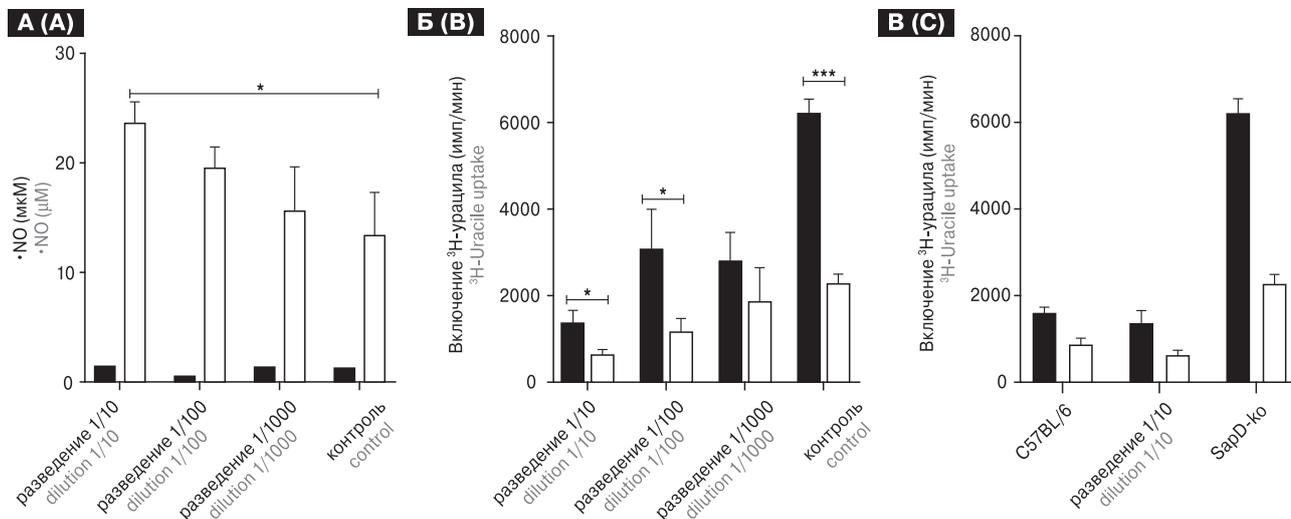


Рисунок 4. Подавление роста *M. tuberculosis* макрофагами перитонеального экссудата, инфицированными сконцентрированными вирусными частицами с искусственным геном сапозина D человека

Figure 4. Mycobacteria's growth inhibition by peritoneal macrophages infected with concentrated viral particles containing artificial human SapD gene

Примечания. Макрофаги перитонеального экссудата мышей линии SapD-ko, инфицированные вирусными частицами с искусственным геном сапозина D человека, культивировали в присутствии микобактерий (■), а также микобактерий и IFN γ (□). Через 72 часа в культурах оценивали количества (NO₂)⁻ (А) и включение 5,6-³H-урацила (Б, В). Включение 5,6-³H-урацила микобактериями в отсутствие макрофагов (5Rv) 7850±180 имп/мин).

Notes. Peritoneal macrophages of SapD-ko mice infected with concentrated viral particles containing artificial human SapD gene were cultured with mycobacteria (■) or mycobacteria and IFN γ (□). After 72 h of incubation (NO₂)⁻ (A) and ³H-Uracil uptake was quantified (B, C). 5,6-³H-Uracil uptake by mycobacteria without macrophages (5Rv) 7850±180 cpm).

инфекции. Глобальный контроль эпидемиологической ситуации по туберкулезу осложняется отсутствием эффективной вакцины [12], распространением лекарственно-устойчивых форм туберкулеза и недостатком быстрых и чувствительных диагностических тестов [16].

Макрофаги организма хозяина захватывают внеклеточный материал, а также освобождаются от использованных компонентов плазматической мембраны в процессе эндоцитоза, при котором образуются короткоживущие органеллы — эндосомы. Из эндосом макромолекулы либо возвращаются обратно в плазматическую мембрану, либо направляются в лизосомы для последующего переваривания и завершения деградации захваченного материала. В кислом содержимом лизосом содержится более 60 различных растворимых гидролитических ферментов, участвующих в переваривании макромолекул. В дополнение к этому лизосомы оснащены белками — активаторами сфинголипидов — сапозинами. Сапозины — кислые, термостабильные, не обладающие ферментативной активностью гликолипопротеины, участвующие в качестве кофакторов в процессах деградации гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными головными группами [7]. Основная функция сапозинов — участие в катаболизме сфинголипидов и переваривании мембран, то есть непосредственное участие в киллинге внутриклеточных «паразитов». Механизм действия этих гликолипопротеинов заключается в связывании и активации той или иной гликозидазы, участвующей в деградации соответствующего сфинголипида, а также во взаимодействии с внутрилизосомными мембранами для обеспечения доступности ли-

пида для соответствующих переваривающих ферментов [6]. Таким образом, сапозины — это консервативное оружие, способное бороться непосредственно с микобактериями, что подтверждается и нашими экспериментами *in vitro*. Мы показали, что интерстициальные легочные макрофаги и макрофаги перитонеального экссудата мышей-нокауты по гену сапозина D достоверно слабее подавляли рост *M. tuberculosis*, чем макрофаги мышей дикого типа (рис. 1 и 2). Присутствие в культуре высокой концентрации IFN, активирующего бактерицидную функцию макрофагов, также не нивелирует дефицита сапозина D (рис. 2). Инфицирование макрофагов лентивирусом, содержащим генетическую конструкцию с искусственным геном сапозина D, то есть компенсация дефицита этого гликопротеина, привело к усилению бактериостатической функции последних (рис. 3). Этот эффект может быть связан как со сдвигом метаболизма липидов, так и с бактерицидной функцией самого сапозина (неопубликованные данные). Механизм действия всех известных на сегодня лекарств объясняется влиянием на различные пути метаболизма микобактерий (ингибирование биосинтеза жирных кислот, арабиногалактана, пептидогликана и биосинтеза белка; ингибирование ДНК-зависимых процессов, протонных насосов и цитохром P450-зависимых монооксигеназ). Таким образом, настоящее исследование может являться предпосылкой биологического обоснования возможности использования генетической конструкции на основе гена природного белка человека, а именно сапозина D, в качестве нового средства лечения туберкулеза.

Работа выполнена в рамках темы НИР 0515-2019-0018.

Список литературы/References

1. Еремеев В.В., Апт А.С. Сапозин-подобные белки в противоинфекционном иммунном ответе // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 597–602. [Yeremeev V.V., Apt A.S. Saposin-like proteins in anti-infectious immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 597–602. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-597-602
2. Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Апт А.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза в экспериментальных моделях // Туберкулез и болезни легких. 2012. Т. 89, № 7. С. 3–11. [Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Apt A.S. Study of molecular mechanisms of tuberculosis pathogenesis in experimental models. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2012, vol. 89, no. 7, pp. 3–11. (In Russ.)]
3. Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Евстифеев В.В., Апт А.С. Взаимодействие Т-лимфоцитов CD4⁺CD27^{hi} и CD4⁺CD27^{lo} с макрофагами при туберкулезной инфекции у мышей // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 12. С. 57–60. [Shepelkova G.S., Mayorov K.B., Evstifeev V.V., Apt A.S. Interaction of T-lymphocytes of CD4⁺CD27^{hi} and CD4⁺CD27^{lo} with macrophages in tuberculous infection in mice. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 12, pp. 57–60. (In Russ.)]
4. Collins H.L., Kaufmann S.H.E. The many faces of host response to tuberculosis. *Immunology*, 2001, vol. 103, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01236.x
5. Hoffman J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5418, pp. 1313–1318. doi: 10.1126/science.284.5418.1313
6. Kishimoto Y., Hiraiwa M., O'Brien J.S. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid Res.*, 1992, vol. 33, no. 9, pp. 1255–1267.
7. Kolter T., Winau F., Schaible U.E., Leippe M., Sandhoff K. Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 50, pp. 41125–41128. doi: 10.1074/jbc.R500015200

8. Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yeremeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyper-resistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 10, pp. 5921–5931. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
9. MacMicking, J.D., North R.J., LaCourse R., Mudgett J.S., Shah S.K., Nathan C.F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, no. 10, pp. 5243–5248. doi: 10.1073/pnas.94.10.5243
10. Majorov K.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Eruslanov E.B., Rubakova E.I., Orlova M.O., Mischenko V.V., Apt A.S. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent Mycobacterium tuberculosis: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 2, pp. 697–707. doi: 10.1128/iai.71.2.697-707.2003
11. Matsuda J., Kido M., Tadano-Aritomi K., Ishizuka I., Tominaga K., Toida K., Takeda E., Suzuki K., Kuroda Y. Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, vol. 13, no. 21, pp. 2709–2723. doi: 10.1093/hmg/ddh281
12. McShane H., Jacobs W.R., Fine P.E., Reed S.G., McMurray D.N., Behr M., Williams A., Orme I.M. BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. *Tuberculosis (Edinb)*, 2012, vol. 92, no. 3, pp. 283–288. doi: 10.1016/j.tube.2011.12.003
13. Nikonenko B.V., Averbakh M.M. Jr., Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 10, pp. 5921–5931. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
14. WHO. Global Tuberculosis report 2019. Geneva: WHO, 2019. URL: https://www.who.int/tb/publications/global_report/ru/ (16.11.2020)
15. Winau F., Schwierzeck V., Hurwitz R., Remmel N., Sieling P.A., Modlin R.L., Porcelli S.A., Brinkmann V., Sugita M., Sandhoff K., Kaufmann S.H., Schaible U.E. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, no. 2, pp. 169–174. doi:10.1038/ni1035
16. Young D.B., Perkins M.D., Duncan K., Barry C.E. 3rd. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J. Clin. Invest.*, 2008, vol. 118, no. 4, pp. 1255–1265. doi: 10.1172/JCI34614

Авторы:

Шепелькова Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Евстифеев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Эргешов А.Э., д.м.н., профессор, директор ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Еремеев В.В., д.м.н., зам. директора по научной работе ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Ergeshov A.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Yeremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Deputy Director of the Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ АДГЕЗИИ И АДГЕЗИВНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Резюме. Цель работы — изучить распространенность генетических детерминант адгезии штаммов уропатогенной *E. coli* и оценить их связь с уровнем специфической и неспецифической адгезии. Объектами исследования стали бактериальные культуры *E. coli* ($n = 33$), выделенные от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей. Принадлежность штаммов к филогенетической группе определяли с помощью Clermont quadruplex-ПЦР. Детекцию генов фимбриальных и афимбриальных адгезинов проводили методом ПЦР по конечной точке. Стандартными методами оценивали уровни специфической адгезии к эритроцитам, неспецифической адгезии к гидрофильной и гидрофобной поверхностям, а также биопленкообразующую способность штаммов. У исследуемых штаммов были детектированы гены адгезинов со следующими частотами: *fimH* — 75,76%, *flu* — 66,67%, *iha* — 39,40%, *papC* — 33,33%. С равной частотой — 18,18% — встречались *sfaDE*, *upaG*, *afa/draBC* и *yqi*, тогда как *eaeA* не обнаруживался вообще. Семь штаммов (21,21%) имели гены только фимбриальных адгезинов и три (9,09%) — только афимбриальных или белков наружной мембраны, у 21 (63,64%) штамма присутствовали одновременно гены обоих типов адгезинов. Среди 33 культур было обнаружено 23 индивидуальных адгезивных генотипа. В 45,45% случаев встречались четыре и более гена адгезии, при этом в 60% такие штаммы принадлежали к филогруппе B2. Расчет отношения шансов показал, что встречаемость генов адгезии *yqi* и *sfaDE* в *E. coli* филогруппы B2 была выше в 14 раз ($OR = 14,286$) по сравнению с другими филогруппами, в 10 раз чаще встречался ген *flu* ($OR = 10,000$). Не было обнаружено связи между наличием генов адгезии и уровнем специфической адгезии к эритроцитам, в то время как были получены достоверные отличия для неспецифической адгезии: *fimH*⁺, *papC*⁺ и *upaG*⁺ штаммы характеризовались более высоким уровнем прикрепления к стеклу. Показано, что фимбриальные адгезины в большей степени определяли бактериальную адгезию и биопленкообразование, чем афимбриальные. Тенденция к формированию более массивных биопленок на поверхности латексного катетера штаммами с положительным генетическим профилем была отмечена для всех носителей генов, участвующих в адгезии.

Ключевые слова: уропатогенные штаммы *Escherichia coli*, гены адгезинов, специфическая адгезия, неспецифическая адгезия, биопленки, филогруппа.

Адрес для переписки:

Кузнецова Марина Валентиновна
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ПФИЦ УрО РАН.
Тел.: 8 912 983-78-35 (моб.).
E-mail: mar@iegm.ru

Contacts:

Marina V. Kuznetsova
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13,
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch
Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 912 983-78-35 (mobile).
E-mail: mar@iegm.ru

Для цитирования:

Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *Escherichia coli* // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 481–490.
doi: 10.15789/2220-7619-GAP-1413

Citation:

Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S. Genetic adhesion profiles and adhesive variability of uropathogenic *Escherichia coli* strains // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 481–490. doi: 10.15789/2220-7619-GAP-1413

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-44-590014-п_а.

GENETIC ADHESION PROFILES AND ADHESIVE VARIABILITY OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S.

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

Abstract. Our study was aimed at investigating prevalence of adhesion genetic determinants among uropathogenic *E. coli* strains and assessing their correlation with level of specific and non-specific adhesion. *E. coli* bacterial cultures (n = 33) isolated from patients with urinary tract infection were examined. A phylogenetic group of strains was detected by using Clermont quadriplex-PCR method. Detection of fimbrial and afimbrial adhesin genes was carried out with end-point PCR. Level of erythrocyte-specific, non-specific hydrophobic and hydrophilic adhesion as well as biofilm formation were estimated by using standard methods. Adhesin genes were detected with the following frequencies: *fimH* — 75.76%, *flu* — 66.67%, *iha* — 39.40%, *papC* — 33.33%. Each of the genes *sfaDE*, *upaG*, *afa/draBC* and *yqi* was found with frequency 18.18%, whereas *eaeA* was not detected. Seven strains (21.21%) carried solely fimbrial adhesin genes, three strains (9.09%) — afimbrial adhesin genes, and twenty-one strains (63.64%) had genes of both adhesin types. Twenty-three individual adhesion genotypes were found among thirty-three UPEC strains. A combination of at least four genes were detected in 45.45% strains, among which 60% belonged to phylogroup B2. Odds ratio for adhesin gene prevalence in B2 group was calculated. It was shown that in B2 group *yqi* and *sfaDE* genes were detected by 14-fold more frequently (OR = 14.286) than in other phylogroups, and *flu* gene was observed at 10-fold higher rate (OR = 10.000). No correlation between such genes and level of adhesion to erythrocytes was found, whereas *fimH*⁺, *papC*⁺ and *upaG*⁺ strains had higher level of non-specific hydrophilic adhesion. It was shown that fimbrial adhesins accounted for bacterial adhesion and biofilm formation stronger than afimbrial ones. Thicker biofilm tended to form on latex catheter surface for strains with positive genetic profile for adhesin gene carriers.

Key words: uropathogenic *Escherichia coli* strains, adhesins genes, specific adhesion, non-specific adhesion, biofilm, phylogroup.

Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) относятся к числу наиболее распространенных инфекционных заболеваний в мире, которые широко встречаются как в амбулаторной, так и в стационарной практике [3, 26, 35]. В основе патогенеза ИМВП лежат взаимоотношения между макро- и микроорганизмом, характер которых зависит как от восприимчивости хозяина, так и от вирулентных свойств возбудителя. Штаммы уropathогенной *Escherichia coli* (УPEC) имеют ряд особенностей, обуславливающих повышенную адаптацию бактерий в мочевыделительном тракте: к ним относятся такие поверхностные структурные компоненты, как липополисахарид (ЛПС) клеточной стенки, полисахаридная капсула, белки наружной мембраны (ОМРs), жгутики, пили, *curlI*-белки и нефимбриальные адгезины [15, 39]. Уropathогенный потенциал *E. coli* последовательно реализуется на следующих этапах инфекционного процесса: адгезии, колонизации, персистенции. Представление адгезивных молекул является, возможно, более важной детерминантой патогенности УPEC при развитии ИМВП, чем токсинообразование или другие факторы вирулентности. Адгезины позволяют бактериям связываться с клетками-мишенями в мочевыводящих путях и избегать быстрого вымывания с потоком мочи, кроме того, первичная адгезия способствует бактериальной инвазии в клетки хозяина [27].

Основными факторами адгезии уropathогенной *E. coli* являются супрамолекулярные нитчатые органеллы: фимбрии I типа, P- и S-фимбрии. Фимбрии I типа с помощью концевой белка *FimH* взаимодействуют с рецептором на уротелиальных клетках, опосредуя прикрепление бактерий, что в итоге приводит к развитию цистита из-за последующей бактериальной инвазии [2, 20]. На примере мышинной модели ИМВП было показано, что фимбрии I типа повышают выживаемость бактерий в мочевыводящих путях, способствуют инвазии и стимулируют воспаление слизистой оболочки [9]. P-фимбрии состоят из гетерополимерных волокон, включающих различные белковые субъединицы, кодируемые опероном *papA-K*. В настоящее время известно, что эти адгезивные органеллы являются критическими факторами вирулентности, которые обеспечивают распознавание патогеном тканей почки и прикрепление во время ИМВП [27]. S-фимбрии способствуют распространению бактерий в тканях хозяина и часто присутствуют у штаммов *E. coli*, которые вызывают сепсис, менингит и восходящие ИМВП, в том числе пиелонефрит. Кроме фимбриальных адгезинов среди УPEC широко распространены нефимбриальные — например, афимбриальный адгезин *Afa*, опосредующий маннозорезистентную гемагглютинацию и адгезию к уротелиальным клеткам [42]. Открытые в последнее десятилетие белки *UraV/C/H/G*, члены семейства аутопортальных адгезинов, проявляют родство к фибронектину и ламинину, обеспе-

чивая прилипание UPEC к эпителию мочевого пузыря. Кроме того, UraG участвует в создании биопленки на пластике, что способствует колонизации урологических катетеров [38]. В бактериальной адгезии значительную роль играют и белки наружной мембраны. Например, гомолог адгезина Irg участвует в колонизации мочевого пузыря и почек [17], а поверхностно локализованный антиген Ag43a вносит вклад в формирование биопленки [37]. Однако считается, что данные адгезины являются менее значимыми для развития ИМВП.

Несмотря на достаточно большое количество уже известных белков, обеспечивающих адгезию UPEC, исследования в данной области продолжаются. В 2009 году был открыт новый фимбриальный адгезин Yqi, участвующий в патогенезе системных инфекций птиц, вызванных *E. coli*. Дальнейшие исследования показали, что ген *yqi* может быть широко распространен среди уропатогенных штаммов, однако роль этого фактора адгезии до сих пор недостаточно изучена [7].

Считается, что принадлежность UPEC к определенной филогенетической группе также определяет их уропатогенный потенциал. Во многих исследованиях показано, что именно бактерии группы B2 или D имеют намного больше факторов вирулентности, в том числе и генов адгезии, чем представители других восьми распознаваемых филогрупп [13, 31, 32].

Цель данного исследования — изучить распространенность генетических детерминант адгезии штаммов уропатогенной *E. coli* и оценить их связь с уровнем специфической и неспецифической адгезии.

Материалы и методы

Штаммы. Объектами исследования стали бактериальные культуры *E. coli* (n = 33), выделенные от пациентов с ИМВП из стационаров и поликлиник г. Перми. Все изоляты были идентифицированы согласно приказу МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 в бактериологических лабораториях лечебных учреждений. Индивидуальность штаммов подтверждена методом генотипирования с использованием ERIC-ПЦР.

Определение филогенетической группы. Принадлежность штаммов к филогруппе определяли с помощью quadruplex-ПЦР, согласно Clermont O. и соавт. (2013).

Детекция генов адгезинов. Наличие генов *fimH* (пили 1 типа), *papC* (P-фимбрии), *sfaDE* (S-фимбрии), *yqi* (Yqi), *afa/draBC* (Afa/Dr адгезины), *upaG* (аутопереносчик), *flu* (поверхностный антиген Ag43a), *iha* (Irg) и *eaeA* (интимин) определяли с помощью ПЦР, используя праймеры (ООО «Синтол», Москва) и программы по рекомендациям исследователей (табл. 1). Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad

Таблица 1. Праймеры для детекции адгезинов

Table 1. Primers for adhesins detection

Фактор адгезии Adhesion factor	Ген Gene	Праймер Primer	Последовательность Sequence	Источник Reference
Фимбриальные адгезины/Fimbrial adhesins				
Фимбрии 1 типа Fimbria type 1	<i>fimH</i>	FimH1	5'-CAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG	[16]
		FimH2	5'-TGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC	
P-фимбрии P-fimbria	<i>papC</i>	Pap1	5'-GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	[23]
		Pap2	5'-ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
S-фимбрии S-fimbria	<i>sfaDE</i>	sfa1	5'-CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	[23]
		sfa2	5'-CGGGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
Yqi	<i>yqi</i>	IMT-P2512	5'-ATGCAATGGCAGTACCCTTC	[7]
		IMT-P2513	5'-CTGGTGGCAACATCAAATTG	
Афимбриальные адгезины/Afimbrial adhesins				
AFA/Dr	<i>afa/draBC</i>	Afa f	5'-GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	[19]
		Afa r	5'-CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	
UraG	<i>upaG</i>	upaG-F	5'-GATAGGCAAGGACGCAAGA	[30]
		upaG-R	5'-GGTCGCAATATCCGTAGT	
Белки наружной мембраны/Outer membrane proteins				
Ag43a	<i>flu</i>	flu-F	5'-GGGTAAGCTGATAATGTCTG	[37]
		flu-R	5'-GTTGCTGACAGTGAGTGTGC	
Irg	<i>iha</i>	IHA-F	5'-CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	[12]
		IHA-R	5'-TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	
Интимин Intimine	<i>eaeA</i>	eaeA-F	5'-GACCCGGCACAAGCATAAGC	[12]
		eaeA-R	5'-CCACCTGCAGCAACAAGAGG	

Таблица 2. Специфическая и неспецифическая адгезия UPEC с учетом генотипа

Table 2. Genotype-dependent specific and non-specific adhesion of UPEC strains

Группа штаммов Group of strains	Уровень специфической адгезии, ИАМ, % Level of specific adhesion, MAI, %	Уровень неспецифической адгезии, % Level of non-specific adhesion, %	
		Гидрофильная поверхность Hydrophilic surface	Гидрофобная поверхность Hydrophobic surface
		<i>fimH</i> ⁺ <i>fimH</i> ⁻	2,70 (2,25–3,75) 2,65 (2,21–3,05)
<i>papC</i> ⁺ <i>papC</i> ⁻	2,70 (2,10–3,90) 2,64 (2,26–3,46)	2,85 (2,56–6,64)* 1,72 (0,99–3,28)	10,06 (7,33–13,23)* 3,49 (1,68–8,81)
<i>sfaDE</i> ⁺ <i>sfaDE</i> ⁻	2,40 (2,00–2,69) 2,75 (2,26–3,85)	3,20 (2,31–7,78) 2,26 (1,17–3,28)	7,05 (1,51–11,49) 5,16 (1,93–9,33)
<i>yqi</i> ⁺ <i>yqi</i> ⁻	2,78 (2,29–3,55) 2,41 (2,21–3,70)	2,46 (1,90–2,62) 3,05 (1,16–3,65)	8,92 (6,75–11,32) 10,97 (1,55–8,98)
<i>afa/draBC</i> ⁺ <i>afa/draBC</i> ⁻	2,50 (2,28–3,02) 2,70 (2,08–3,75)	1,60 (1,48–1,74) 2,62 (2,44–4,16)	4,23 (2,13–6,28) 6,44 (10,04–10,48)
<i>upaG</i> ⁺ <i>upaG</i> ⁻	2,55 (2,31–3,64) 2,68 (2,20–3,65)	4,13 (0,80–7,20)* 2,28 (1,48–3,25)	5,36 (1,88–8,23) 5,58 (1,83–10,07)
<i>flu</i> ⁺ <i>flu</i> ⁻	2,60 (2,20–3,55) 2,93 (2,37–4,40)	2,46 (1,48–3,25) 2,40 (1,30–4,16)	6,76 (2,38–10,65) 3,26 (0,87–8,32)
<i>iha</i> ⁺ <i>iha</i> ⁻	2,64 (2,06–3,75) 2,70 (2,27–3,26)	1,66 (0,13–2,63) 2,82 (1,59–4,45)	6,65 (3,30–10,25) 4,27 (2,26–11,49)

Примечание. * — уровень достоверности $p < 0,05$ (M–W-test).

Note. * — statistical significance, $p < 0.05$ (M–W-test).

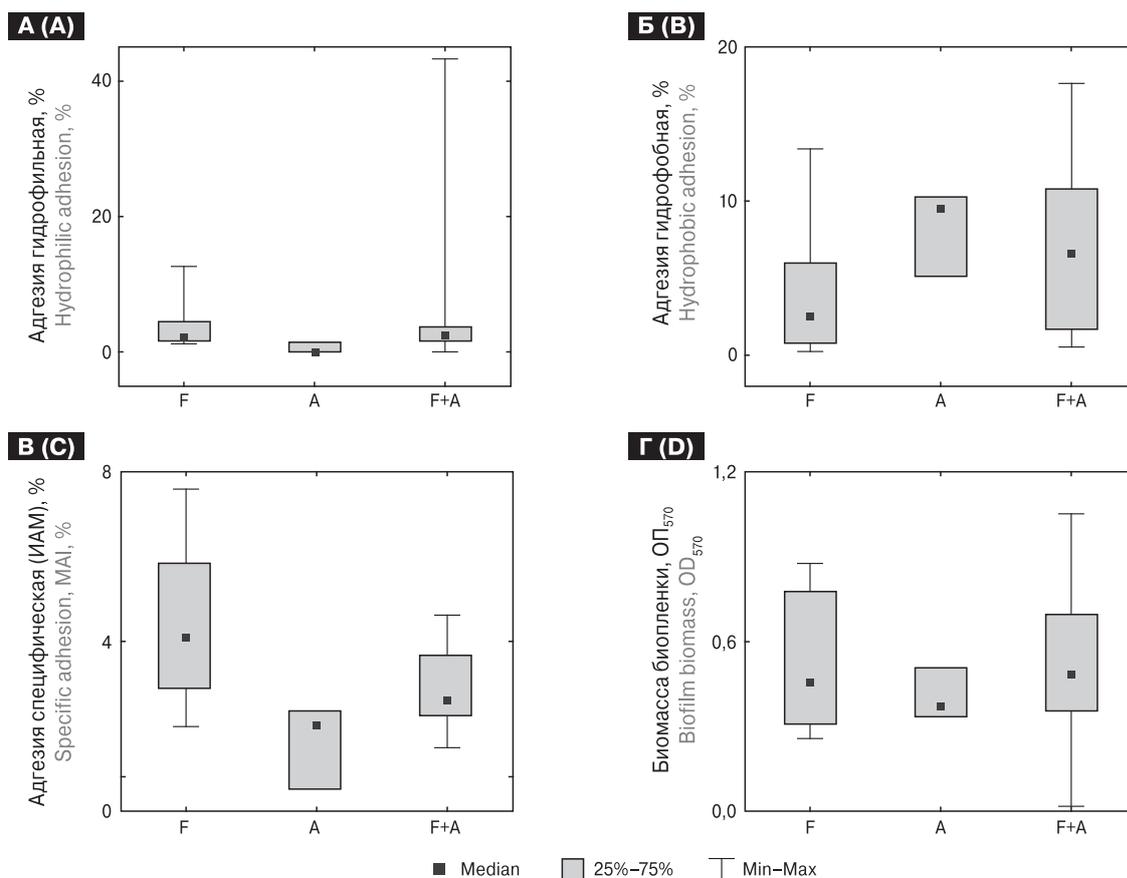


Рисунок 2. Уровни адгезии клеток UPEC к стеклу (А), полистиролу (Б), эритроцитам (В) и массивность биопленки (Г) в зависимости от присутствия генов фимбриальных (F) и афимбриальных (А) адгезинов или их комбинации (F+A)

Figure 2. Adhesion levels of UPEC cells to glass (A), polystyrene (B), erythrocytes (C), and biofilm biomass (D) related to fimbrial adhesin genes (F) and afimbrial adhesin genes (A) or fimbrial + afimbrial adhesin gene combination (F+A)

Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с использованием системы гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США).

Определение уровня неспецифической и специфической адгезии. Определение уровня неспецифической адгезии проводили в стеклянных пенициллиновых флаконах (гидрофильная поверхность) и в лунках полистиролового 96-луночного плоскодонного планшета (Медполимер, Россия) (гидрофобная поверхность) в течение 1 часа, согласно Ю.А. Николаеву [4]. Уровень специфической адгезии бактерий к эритроцитам человека (A0+) оценивали по методу Брилиса В.И. с соавт. [1]. Адгезивную активность бактерий оценивали с помощью индекса адгезии микроорганизма (ИАМ).

Анализ бактериальных биопленок. Биопленки формировали на катетере из латекса (катетер Фолея, 2-ходовой, Arxmed International BV, Нидерланды) в среде Луриа–Бертани (LB-среда; Sigma, США) в течение 24 часов. Биомассу биопленки оценивали согласно Merritt J.H. и соавт. [25] на планшетном ридере Tecan infinite M200 (Tecan, Швейцария) при длине волны 570 нм в ОЕ.

Статистика. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica (версия 10). Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1–Q3). Достоверность различий независимых выборок определяли с помощью критерия Манна–Уитни (M–W-test) при уровне достоверности $p < 0,05$. При сравнении качественных признаков для выявления статистически значимых различий определяли χ^2 (с поправкой Йейтса) или точный критерий Фишера (F-test). Для оценки значимости признака вычисляли отношение шансов (OR) с определением 95%-ного доверительного интервала.

Результаты

Распространенность генов адгезинов. У исследуемых штаммов самым часто детектируемым геном адгезина был универсальный для бактерий *E. coli* *fimH* (75,76%). Вторым по распространенности оказался ген *flu*, кодирующий поверхностный антиген Ag43a (66,67%). Ген *iha*, гомолог адгезина, был обнаружен у 39,40% штаммов. В 33,33% детектировали ген Р-фимбрий *papC*. С равной частотой — 18,18% — встречались ген S-фимбрий *sfaDE*, гены нефимбриальных адгезинов *upaG* и *afa/draBC*, а также ген *yqi*, кодирующий фимбриальный адгезин, ассоциированный с группой патогенных для птиц *E. coli* (АРЕС). Ген *eaeA*, обеспечивающий адгезию и инвазию штаммов энтеропатогенной (ЕРЕС) и энтерогеморрагической (ЕНЕС) *E. coli*, не был обнаружен ни в одном из штаммов.

Комбинации генов адгезинов. В результате анализа встречаемости генов адгезинов среди 33 штаммов были определены 23 индивидуальных адгезивных генотипа. В представленной выборке повторялись следующие комбинации генов: *fimH* ($n = 4$), *fimH+flu* ($n = 5$), *fimH+flu+iha+upaG* ($n = 2$) и *fimH+flu+iha+papC* ($n = 2$). В целом мновалентный адгезивный генотип обнаружен в 6 (18,18%) случаях, два гена в любой комбинации выявлены у 7 штаммов (21,21%), три — у 3 (9,09%). Множественные гены адгезии (4 и более) детектированы в 15 (45,45%) случаях, два штамма не имели ни одного гена. Семь штаммов (21,21%) имели гены только фимбриальных адгезинов и три (9,09%) — только афимбриальных или белков наружной мембраны, у 21 (63,64%) штамма присутствовали одновременно гены обоих типов адгезинов. Вариативность сочетаний разных детерминант адгезии представлена на рис. 1 (II обложка).

Связь наличия генов адгезинов с уровнями специфической и неспецифической адгезии и биопленкообразования. Не было обнаружено связи между наличием каких-либо генов адгезина (без учета других генов) или их комбинации и уровнем специфической адгезии штаммов (табл. 2). При этом были получены достоверные отличия в случае неспецифической адгезии: штаммы с профилем *fimH*⁺, *papC*⁺ и *upaG*⁺ имели более высокий уровень адгезии к стеклу (*papC*⁺ — и к полистиролу), чем штаммы без данных генов.

Интересно, что штаммы, несущие гены только фимбриальных адгезинов, в среднем имели

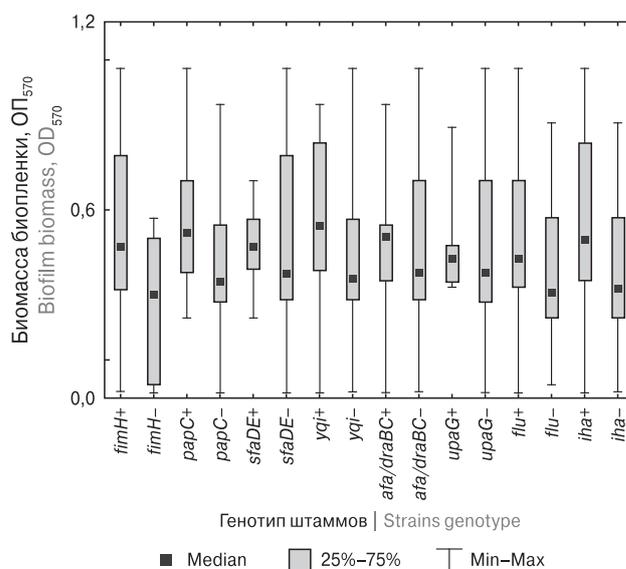


Рисунок 3. Биомасса биопленок штаммов UPEC с разными генотипами адгезии на поверхности латексного катетера

Figure 3. Genotype-specific biofilm biomass of UPEC strains on latex catheter surface

Таблица 3. Частота встречаемости представителей филогруппы B2 среди штаммов UPEC с разными генотипами

Table 3. Genotype-specific prevalence of B2 phylogroup members among UPEC strains

Группа Group	Адгезин-ассоциированные гены/Adhesion-associated genes							
	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>sfaDE</i>	<i>yqi</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>upaG</i>	<i>flu</i>	<i>iha</i>
«+» генотип «+» genotype	36%	54,54%	83,33%*	83,33%*	66,67%	66,7%	50%*	53,85%
«-» генотип «-» genotype	37,5%	27,27%	25,93%	25,93%	29,63%	29,63%	9,09%	25%

Примечание. * — уровень достоверности $p < 0,05$ (F-test).Note. * — statistical significance, $p < 0.05$ (F-test).

бóльшие показатели адгезии к стеклу и эритроцитам (рис. 2А, В), в то время как штаммы с генами только афимбриальных адгезинов — к полистиролу (рис. 2Б).

Адгезия клеток микроорганизма к поверхности является первоначальным этапом колонизации и биопленкообразования. Тенденция к формированию более массивных биопленок на поверхности латексного катетера штаммами с положительным генетическим профилем была отмечена для всех генов, участвующих в адгезии (рис. 3). Биопленкообразование в группе штаммов, несущих гены фимбриальных адгезинов, также было выше, чем в группе носителей генов афимбриальных адгезинов и белков наружной мембраны, при этом комбинация двух типов адгезинов давала UPEC некоторые преимущества в формировании биопленки (рис. 2Г).

Связь наличия генов адгезинов с филогенетической группой штаммов. Анализ связи филогруппы и факторов адгезии показал, что 60% штаммов, несущих 4 и более гена адгезинов, принадлежали к филогруппе B2. Преобладание группы B2 среди UPEC с положительным адгезивным профилем было характерно для всех представленных генов, за исключением универсального для *E. coli* фимбриального адгезина *fimH* (табл. 3). Важно отметить, что достоверно чаще с данной филогруппой был ассоциирован ген *yqi*, для которого описана роль в патогенезе системных инфекций птиц. Кроме того, B2 также была широко распространена среди штаммов, несущих детерминанту *sfaDE*, которая часто встречается у менингит- и сепсис-ассоциированных (NMES и SEPEC) штаммов *E. coli*.

Расчет отношения шансов показал, что встречаемость генов адгезии *yqi* и *sfaDE* у *E. coli* филогруппы B2 была выше в 14 раз (OR = 14,286), в 10 раз чаще встречался ген *flu* (OR = 10,000). Гены *afa/draBC* и *upaG* (OR = 4,750), *iha* (OR = 3,500) и *papC* (OR = 3,200) также детектировались у представителей данной группы с большей частотой. Кроме того, в группе B2 вероятность встретить 4 и более гена одновременно была в 7,5 раз (OR = 7,500) выше, чем в совокупности штаммов других групп.

Обсуждение

В последнее время появляется все больше данных, указывающих на то, что преимущественное связывание микроорганизма со специфичными субстратными молекулами определяется его принадлежностью к конкретному адгезивному фенотипу и обуславливает способность успешно колонизировать разные экологические ниши и вызывать патологический процесс. Адгезин FimH считается самым распространенным фактором адгезии среди UPEC. Проведенные ранее эпидемиологические исследования показали, что большинство штаммов-возбудителей ИМВП являются носителями детерминанты *fim*⁺, и именно FimH является принципиальным фактором уропатогенности *E. coli* [11, 36, 41]. Среди фимбриальных адгезинов также широко распространены Р-фимбрии, ответственные за адгезию при пиелонефрите, многие исследования показывают, что как минимум половина штаммов UPEC и не менее трети штаммов, выделенных при других нозологических формах ИМВП, несут ген *papC* [8, 11, 33]. S-фимбрии распознают лактозосодержащие рецепторы и экспрессируются преимущественно штаммами SEPEC и NMES, но могут встречаться и у UPEC [8, 42]. В большинстве работ, посвященных распространенности фимбриальных адгезин-ассоциированных генов среди уропатогенных штаммов, показано двукратное снижение частот встречаемости в ряду *fimH* > *papC* > *sfaDE*, что нашло подтверждение и в нашем исследовании: *fimH* (75,76%), *papC* (30,30%), *sfaDE* (18,18%). Следует отметить, что достаточно часто (18,18%) детектировался новый ген *yqi*, кодирующий фимбриальный адгезин Yqi, ассоциированный с группой APEC, являющийся ключевым фактором адгезии на начальных стадиях инфицирования легких птицы [7]. В настоящее время APEC относятся к категории внекишечных патогенных *E. coli* (ExPEC), куда входят также UPEC, NMES и SEPEC, что, в свою очередь, подтверждает зоонотический потенциал APEC либо указывает на генетическую пластичность UPEC.

Менее широко среди уропатогенных *E. coli* распространены гены афимбриальных адгезинов и белков наружной мембраны. Клинические и экспериментальные данные показывают, что штаммы с адгезинами Afa или Dr обладают свойствами, способствующими формированию хронической или рецидивирующей инфекции [22]. По данным литературы, встречаемость этих факторов среди UPEC достаточно сильно варьируется. Так, Zhao L. и соавт. детектировали *afa* только у 4% изолятов [42], у 11,30% штаммов данный ген был обнаружен в исследовании Spindola M.G. и соавт. [33], а Asadi S. и соавт. показали присутствие *afa* более чем в 50% случаев [8]. Белки семейства аутотранспортных адгезинов UraB/C/H/G не являются специфичными для уропатогенов, так как их гомологи обнаруживаются среди различных штаммов *E. coli*, однако входят в число детектируемых у UPEC [8]. В данной работе гены нефимбриальных адгезинов *afa/draBC* и *upaG* встречались с частотой 18,18%. Антиген 43а, представляющий собой белок наружной мембраны, кодируется геном *flu* и широко распространен среди штаммов *E. coli*, включая UPEC. Интересно, что он оказался на втором месте по встречаемости после FimH и в изучаемых нами штаммах. Также в представленном исследовании ген гомолога адгезина IrgA (*iha*), относящийся к факторам патогенности диареегенных *E. coli*, был обнаружен в 39,4% случаев. Несмотря на то, что ген *eaeA*, обеспечивающий адгезию и инвазию EPEC, не был детектирован ни в одном из штаммов нашей коллекции, ранее уже сообщалось, что у UPEC этот ген также может встречаться [1, 10].

Команда Melican K. (2011) обнаружила синергетические функции двух типов фимбрий, которые обеспечивают бактериальную колонизацию в динамических условиях *in vivo*. Было показано, что Р-фимбриии способствуют первичной адгезии на клетках трубчатого эпителия, в то время как фимбриии 1 типа опосредуют колонизацию центра канальца через механизм, который включает межбактериальные связывания и формирование биопленки [24]. Результаты, полученные Szemiako K. и соавт. (2013), свидетельствуют, что комбинации генов, кодирующих два фактора адгезии, таких как *papC+afa/dra*, *papC+sfaD/sfaE* или *sfaD/sfaE+afa/dra*, *sfaD/sfaE+fim*, определяют большую вероятность транслокации штамма из мочевыводящих путей в кровотоки [34]. Согласно данным Johnson R.J. и соавт. (2002), штамм можно считать ExPEC, если он содержит два или более из следующих генов вирулентности: *papC*, *sfaD/sfaE*, *afa/dra*, *iutA* (рецептор аэробактина) и *kpsM II* (синтез капсулы группы 2) [18]. В работе Bashir S. и соавт. (2012) отмечено, что в штаммах UPEC могут присутствовать до четырех ад-

гезин-ассоциированных генов [10]. Наши данные показывают возможность одновременного присутствия шести генов адгезинов. Интересен тот факт, что редко детектируемые гены всегда встречались в комбинации с некоторыми более распространенными генами, например, *afa/draBC+iha*, при этом *afa/draBC* не детектировался одновременно с *papC* или *upaG*, а ген *sfaDE* не обнаруживался вместе с *iha* или *afa/draBC*. В ранее проведенных исследованиях такие комбинации описаны только в единичных случаях [1, 10].

Оценка влияния наличия генов на способность закрепления клеток UPEC на разных поверхностях показала, что штаммы *fimH⁺*, *papC⁺* и *upaG⁺* имели более высокий уровень адгезии к стеклу (а *papC⁺* — еще и к полистиролу), чем штаммы без данных генов. Значительное влияние адгезина PapC на адгезию и биопленкообразование штаммов было показано ранее [14, 29]. Тенденция к формированию более массивных биопленок на поверхности латексного катетера штаммами с положительным генетическим профилем была отмечена для всех генов, участвующих в адгезии.

Наличие у микроорганизма нескольких генов не всегда проявляется в синергетическом действии. Например, в исследовании Ulett G.C. и соавт. (2007) было продемонстрировано, что в присутствии фимбрий 1 типа, которые предотвращают тесный контакт бактериальных клеток, влияние Ag43 на аутоагрегацию и образование биопленки уменьшалось [37]. Учитывая данный факт и многообразие комбинаций генов адгезинов в исследуемых UPEC, было достаточно сложно установить достоверные связи между наличием какого-либо гена и уровнем адгезии или биопленкообразования штаммов. Несмотря на это, тенденции к более эффективному закреплению в случае адгезии к эритроцитам, а также в случае неспецифической адгезии к стеклу прослеживаются у фимбриальных генов. Афимбриальные адгезины или белки наружной мембраны, напротив, в большей степени обуславливают неспецифическое связывание с гидрофобной поверхностью полистирола, что ранее было описано для аутотранспортного UraG [38] или поверхностного антигена Ag43а [37]. Интересно, что при формировании биопленки на катетере больше преимуществ имели штаммы, у которых были детектированы комбинации генов обоих типов адгезинов.

Следует отметить, что штаммы, несущие множественные детерминанты адгезии, чаще принадлежат к филогруппе B2, ассоциированной с высоким уровнем вирулентности UPEC. При этом внутри группы B2 все штаммы имеют не менее трех генов адгезии. Расчет отношения шансов показал, что гены изученных адгези-

нов намного чаще встречались в данной группе, за исключением *fimH* (OR = 0,938), кодирующего универсальные структуры для адгезии *E. coli*. Аналогичные данные были получены Yahiaoui M. и соавт. (2015), которые показали, что полирезистентные UPEC филогрупп В2 и D чаще обладали факторами вирулентности, участвующими в колонизации и длительном персистировании у людей. При этом фимбрии 1 типа (*fimH*) были «вездесущими» (97,1%), а Р-фимбрии (*papA* и *papGII*), S-фимбрии (*sfaDE*) и Afa/Dg присутствовали в основном у представителей филогруппы В2 [40]. В проведенном в Иране исследовании по изучению взаимосвязи между филогенетической группой штамма и присутствием маркеров вирулентности среди UPEC выявлена существенная связь между группой В2 и всеми изученными генами адгезии (*fimH*, *papC*, *papG*, *afa*, *sfa/foc*) [28]. В отличие от большинства сообщений о филогенетическом разнообразии UPEC, исследование Khairy R.M. и соавт. (2019) выявило, что наиболее распространенной была филогенетическая группа А, а группа В2 была второй по частоте встречаемости. Но в этом исследовании также делается вывод, что штаммы с комбинированными паттернами вирулентности из четырех или пяти генов, включая адгезин-ассоциированные детерминанты, принадлежали только к филогенетической группе В2 [21].

Заключение

Настоящее исследование свидетельствует о высокой распространенности адгезин-кодирующих генов в UPEC и подтверждает многочисленные данные о том, что эти структуры являются ключевыми факторами развития ИМВП. Множественные гены адгезии (4 и более) детектированы почти у половины культур,

при этом более чем в 60% штаммов присутствуют одновременно гены и фимбриальных, и афимбриальных адгезинов. Показано, что группа UPEC может быть высоко гетерогенной по адгезивному профилю: среди 33 штаммов были определены 23 индивидуальные комбинации изученных генов. В целом у штаммов — носителей генов фимбриальных адгезинов выявлены тенденции к более высокому уровню биопленкообразования и специфической и неспецифической адгезии к стеклу.

Механизмы колонизационной активности UPEC разнообразны и до конца не изучены, но, безусловно, особенности адгезии и биопленкообразования детерминируются целой группой факторов, каждый из которых принимает участие на конкретном этапе патогенеза ИМВП. Знания о молекулярных механизмах, обеспечивающих сайт-специфическое взаимодействие и проявление патогенных свойств бактерий в определенном локусе, а также об ответной реакции макроорганизма постоянно пополняются. Например, профили углеводов ткани хозяина и защитных молекул, таких как белок Тамма–Хорсфалла (Tamm–Horsfall protein), являются важными детерминантами FimH-опосредованной бактериальной адгезии. С другой стороны, возникающие в результате мутаций или горизонтального переноса варианты различных адгезинов могут расширять возможности микроорганизмов, в частности UPEC, в освоении новых экологических ниш. Остается открытым вопрос, связанный с обнаружением у штаммов UPEC адгезинов, считающихся специфичными для EPEC или APEC: происходит ли изменение факторов патогенности UPEC, обусловленное трансфером генетических детерминант между бактериями, или «не-UPEC» популяции бактерий колонизируют нетипичные для них биотопы?

Список литературы/References

1. Брилис В.И., Брилен Т.А., Ленцнер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210–212. [Brilis V.I., Brilen T.A., Lencner Ch.P. The methodology for studying the adhesive process of microorganisms. *Laboratornoe delo = Laboratory Science*, 1986, no. 4, pp. 210–212. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В., Гриценко В.А., Вялкова А.А. Факторы уропатогенности бактерий: роль в патогенезе и значение в диагностике пиелонефрита // Нефрология и диализ. 2001. Т. 3, № 4. С. 469–475. [Bukharin O.V., Gritsenko V.A., Vyalkova A.A. Factors of uropathogenicity of bacteria: role in pathogenesis and importance in diagnosis of pyelonephritis. *Nefrologia i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2001, vol. 3, no. 4, pp. 469–475. (In Russ.)].
3. Жабченко И.А. Уропатогенные штаммы *Escherichia coli*: особенности функционирования, факторы вирулентности, значение в клинической практике // Таврический медико-биологический вестник. 2013. Т. 16, № 2. С. 201–206. [Zhabchenko I.A. Uropathogenic stamms of *Escherichia coli*: features of functioning, factors of virulence, value in clinical practice. *Tavrisheskiy medico-biologicheskii vestnik = Tavrisheskiy Medical-Biological Bulletin*, 2013, vol. 16, no. 2, pp. 201–206. (In Russ.)]
4. Николаев Ю.А. Регуляция адгезии у бактерий *Pseudomonas fluorescens* под влиянием дистантных межклеточных взаимодействий // Микробиология. 2000. Т. 69, № 3. С. 356–361. [Nikolaev U.A. Regulation of adhesion in bacteria *Pseudomonas fluorescens* under the influence of dissentative intercellular interactions. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2000, vol. 69, no. 3, pp. 356–361. (In Russ.)]
5. Abe C.M., Salvador F.A., Falsetti I.N., Vieira M.A.M., Blanco J., Blanco J.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2008, vol. 52, pp. 397–406. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x

6. Allsopp L.P., Beloin C., Ulett G.C., Valle J., Totsika M., Sherlock O., Ghigo J.M., Schembri M.A. Molecular characterization of UpaB and UpaC, two new autotransporter proteins of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, pp. 321–332. doi: 10.1128/IAI.05322-11
7. Antão E.M., Ewers C., Gürlebeck D., Preisinger R., Homeier T., Li G., Wieler L.H. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 11: e7796. doi: 10.1371/journal.pone.0007796
8. Asadi S., Kargar M., Solhjoo K., Najafi A., Ghorbani-Dalini S. The association of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* with antibiotic resistance, Jundishapur. *J. Microbiol.*, 2014, vol. 7, no. 5: e9936. doi: 10.5812/jjm.9936
9. Bahrani-Mougeot F.K., Buckles E.L., Lockatell C.V., Hebel J.R., Johnson D.E., Tang C.M. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.*, 2002, vol. 45, no. 4, pp. 1079–1093. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03078.x
10. Bashir S., Haque A., Sarwar Y., Ali A., Anwar M.I. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2012, vol. 11: 23. doi: 10.1186/1476-0711-11-23
11. Chakraborty A., Adhikari P., Shenoy S., Saralaya V. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* isolates at a tertiary care hospital in South India. *Ind. J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 35, pp. 305–310. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_14_291
12. Chapman T.A., Wu X.Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.J. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 7, pp. 4782–4795. doi: 10.1128/AEM.02885-05
13. Dadi B.R., Abebe T., Zhang L., Mihret A., Abebe W., Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 108. doi: 10.1186/s12879-020-4844-z
14. 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: doc11. doi: 10.3205/dgkh000254
15. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, no. 5, pp. 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432
16. Guiral E., Bosch J., Vila J., Soto S.M. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and non-pregnant women: relationship with virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, vol. 314, pp. 170–173. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02160.x
17. Johnson J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, vol. 4, no. 1, pp. 80–128. doi: 10.1128/cmr.4.1.80
18. Johnson J.R., Russo T.A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): the “other bad *E. coli*”. *J. Lab. Clin. Med.*, 2002, vol. 139, pp. 155–162. doi: 10.1067/mlc.2002.121550
19. Johnson J.R., Stell A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 181, no. 1, pp. 261–272. doi: 10.1086/315217
20. Jones B.W. Glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell*, 1995, vol. 82, no. 6, pp. 1013–1023. doi: 10.1016/0092-8674(95)90280-5
21. Khairy R.M., Mohamed E.S., Abdel Ghany H.M., Abdelrahim S.S. Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 9: e0222441. doi: 10.1371/journal.pone.0222441
22. Le Bouguenec C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2005, vol. 295, no. 6–7, pp. 471–478. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.001
23. Le Bouguenec C., Archambaud M., Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, pp. 1189–1193.
24. Melican K., Sandoval R.M., Kader A., Josefsson L., Tanner G.A., Molitoris B.A., Richter-Dahlfors A. Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 2: e1001298. doi: 10.1371/journal.ppat.1001298
25. Merritt J.H., Kadouri D.E., O’Toole G.A. Growing and analyzing static biofilm. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2005, chapter 1, unit 1: 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00
26. Morales-Espinosa R., Hernandez-Castro R., Delgado G., Mendez J.L., Navarro A., Manjarrez A., Cravioto A. UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections. *J. Infect. Develop. Count.*, 2016, vol. 10, no. 4, pp. 317–328. doi: 10.3855/jidc.6652
27. Mulvey M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.*, 2002, vol. 4, no. 5, pp. 257–271. doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x
28. Najafi A., Hasanpour M., Askary A., Aziemzadeh M., Hashemi N. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiol.*, 2017, vol. 63, no. 3, pp. 335–343. doi: 10.1007/s12223-017-0570-3
29. Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Dahbi G., Blanco M., del Carmen Ponte M., Soriano F. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb. Pathog.*, 2008, vol. 45, no. 2, pp. 86–91. doi: 10.1016/j.micpath.2008.03.003
30. O’Hara R.W., Jenks P.J., Emery M., Upton M. Rapid detection of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* multi-locus sequence type 127 using a specific PCR assay. *J. Med. Microbiol.*, 2018, vol. 68, no. 2, pp. 188–196. doi: 10.1099/jmm.0.000902
31. Rasha M.K., Ebtisam S.M., Hend M.A.G., Soha S.A. Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 9: e0222441. doi: 10.1371/journal.pone.0222441

32. Sheikh A.F., Goodarzi H., Yadyad M.J., Amin S.A.M., Jomehzadeh N., Ranjbar R., Moradzadeh M., Azarpira S., Akhond M.R., Hashemzadeh M. Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Infect. Drug Resist.*, 2019, vol. 12, pp. 2039–2047. doi: 10.2147/IDR.S199764
33. Spindola M.G., Cunha M.P.V., Moreno L.Z., Amigo C.R., Silva A.P.S., Parra B.M., Poor A.P., de Oliveira C.H., Perez B.P., Knöbl T., Moreno A.M. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from sows. *Veter. Quart.*, 2018, vol. 38, no. 1, pp. 79–87. doi: 10.1080/01652176.2018.1519321
34. Szemiako K., Krawczyk B., Samet A., Śledzińska A., Nowicki B., Nowicki S., Kur J. A subset of two adherence systems, acute pro-inflammatory pap genes and invasion coding *dra*, *fim* or *sfa*, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, vol. 32, pp. 1579–1582. doi: 10.1007/s10096-013-1913-x
35. Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8: 1566. doi: 10.3389/fmicb.2017.01566
36. Tiba M.R., Yano T., Leite Dda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2008, vol. 50, no. 5, pp. 255–260. doi: 10.1590/s0036-46652008000500001
37. Ulett G.C., Valle J., Beloin C., Sherlock O., Ghigo J.M., Schembri M.A. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 7, pp. 3233–3244. doi: 10.1128/IAI.01952-06
38. Valle J., Mabbett A.N., Ulett G.C., Toledo-Arana A., Wecker K., Totsika M., Schembri M.A., Ghigo J.M., Beloin C. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, pp. 4147–4161. doi: 10.1128/JB.00122-08
39. Wiles T.J., Kulesus R.R., Mulvey M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.*, 2008, vol. 85, no. 1, pp. 11–19. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.007
40. Yahiaoui M., Robin F., Bakour R., Hamidi M., Bonnet R., Messai Y. Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb. Drug Resist.*, 2015, vol. 21, pp. 516–526. doi: 10.1089/mdr.2015.0045
41. Yun K.W., Kim H.Y., Park H.K., Kim W., Lim I.S. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2014, vol. 47, no. 6, pp. 455–461. doi: 10.1016/j.jmii.2013.07.010
42. Zhao L., Gao S., Huan H., Xu X., Zhu X., Yang W., Gao Q., Lui X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiol.*, 2009, vol. 155, pp. 1634–1644. doi: 10.1099/mic.0.024869-0

Авторы:

Кузнецова М.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия;

Гизатуллина Ю.С., аспирант лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

Authors:

Kuznetsova M.V., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Gizatullina J.S., PhD Student, Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.03.2020
Принята к печати 21.05.2020

Received 16.03.2020
Accepted 21.05.2020

MOLECULAR DIAGNOSTICS FOR VERIFICATION OF PLEURAL TUBERCULOSIS IN MOROCCO

I. Chaoui^a, S. Taoudi^b, A. Oudghiri^a, J. Benamor^b, J. Bourkadi^b, M. El Mzibri^a

^a National Center for Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco

^b Moulay Youssef Hospital, Rabat, Morocco

Abstract. Pleural tuberculosis (pTB) is a very common form of extrapulmonary tuberculosis (TB). pTB diagnostics represents a major burning challenge worldwide due to the limitations of available conventional diagnostic tools. These latter include microscopic examination of the pleural fluid for acid-fast bacilli, mycobacterial culture of pleural fluid in solid or liquid media, sputum or pleural tissue, and histopathological examination of pleural tissue; these tests have recognized limitations for clinical use. Hence, to overcome these limitations, attention has been devoted to new nucleic acid amplification (NAA) diagnostic tests such as the polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (RT-PCR), owing to their accuracy, rapidity, high sensitivity and specificity. Within this context, this prospective study was conducted to evaluate the performance of molecular diagnosis methods for differentiation between tuberculosis and non-tuberculosis pleural effusions. Fifty patients with pleural effusion were enrolled in this prospective study in Rabat, Morocco. The efficacy of conventional polymerase chain reaction (PCR) in the diagnostics of tuberculous pleurisy by targeting *IS6110* and mycobacterial internal transcribed spacer (MYITS) was evaluated compared to histopathologic examination and culture data. Our results showed that *IS6110* PCR could “rule in” pTB, the sensitivity and specificity being 41.6% and 85.7%, respectively. Therefore, the findings confirmed that molecular tests exert a relatively high specificity in EPTB but lower sensitivity, thus a positive test is considered as a pTB case whereas negative one cannot exclude the disease. Although the study was limited by a small sample size, it adds to the body of evidence of usefulness of molecular testing as adjuncts to histopathologic examination for accurate diagnosis of pTB, to treat timely and to avoid the emergence and spread of drug resistant pTB. However, further efforts should be made to increase the sensitivity of NAA methods and to identify the best molecular targets to be useful in clinical practice.

Key words: pleural tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, polymerase chain reaction, *IS6110*, mycobacterial internal transcribed spacer (MYITS).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ВЕРИФИКАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПЛЕВРИТА В МАРОККО

Шауи И.¹, Тауди С.², Удгири А.¹, Бенамор Д.², Буркади Д.², Эль Мзибри М.¹

¹ Национальный центр энергетики, ядерных наук и технологий, Рабат, Марокко

² Больница им. Мулая Юссефа, Рабат, Марокко

Резюме. Туберкулезный плеврит (pleural tuberculosis — pTB) является очень распространенной формой внелегочного туберкулеза (ТБ). Его диагностика представляет собой серьезную проблему во всем мире из-за недостатков традиционных диагностических методов. К последним относятся микроскопическое исследование плевральной жидкости на наличие кислотоустойчивых микроорганизмов, культивирование микобактерий из плеврального экссудата на твердых или жидких средах и гистологическое исследование биопсии плевры.

Адрес для переписки:

Шауи Имане
10001, Марокко, Рабат, п.я. 1382, Национальный центр
энергетики, ядерных наук и технологий.
Тел.: +212 537 713 205. Факс: +212 537 711 846.
E-mail: im_chaoui@yahoo.fr, chaoui@cnesten.org.ma

Contacts:

Imane Chaoui
B.P. 1382 R.P. 10001, National Center of Energy,
Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco.
Phone: +212 537 713 205. Fax: +212 537 711 846.
E-mail: im_chaoui@yahoo.fr, chaoui@cnesten.org.ma

Для цитирования:

Шауи И., Тауди С., Удгири А., Бенамор Д., Буркади Д., Эль Мзибри М.
Молекулярная диагностика в верификации туберкулезного плеврита
в Марокко // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 491–496.
doi: 10.15789/2220-7619-MDO-1399

Citation:

Chaoui I., Taoudi S., Oudghiri A., Benamor J., Bourkadi J., El Mzibri M.
Molecular diagnostics for verification of pleural tuberculosis in Morocco //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,
vol. 11, no. 3, pp. 491–496. doi: 10.15789/2220-7619-MDO-1399

В связи с этим наше внимание было направлено на разработку новых диагностических тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР и РТ-ПЦР), как наиболее точных, быстрых, высокочувствительных и специфичных. В этом контексте данное исследование было проведено для оценки эффективности методов молекулярной диагностики при дифференциации микобактерий туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий в плевральном экссудате. Пятьдесят пациентов с плевритом были включены в проспективное исследование в г. Рабат, Марокко. Эффективность ПЦР двух ДНК-мишеней — *IS6110* и микобактериального внутреннего транскрибируемого спейсера (*MYITS*) — для диагностики туберкулезного плеврита оценивали на основании сравнения с результатами гистологического исследования и культивирования. Наши результаты показали, что *IS6110*-ПЦР может выявить рТВ с чувствительностью и специфичностью 41,6 и 85,7% соответственно. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что молекулярные тесты имеют относительно высокую специфичность для диагностики внелегочного туберкулеза, но более низкую чувствительность, поэтому положительный результат рассматривается как подтверждение рТВ, тогда как отрицательный тест не может исключать заболевание. Хотя исследование было ограничено небольшим размером выборки, оно добавляет к совокупности доказательств полезности молекулярного тестирования в качестве дополнения к гистологическому исследованию для точной диагностики рТВ, своевременного лечения и предотвращения появления и распространения лекарственно-устойчивого рТВ. Необходимы дальнейшие исследования для повышения чувствительности молекулярных методов и определения оптимальных молекулярных мишеней, которые могут быть полезны в клинической практике.

Ключевые слова: туберкулезный плеврит, *Mycobacterium tuberculosis*, полимеразная цепная реакция, *IS6110*, внутренний транскрибируемый спейсер микобактерий (*MYITS*).

Introduction

Tuberculosis (TB) is a major public health concern worldwide. The World Health Organization (WHO) estimated 10.4 million incident cases of TB and 1.67 million TB deaths in 2017. Of the 6.4 million new TB cases recognized by WHO in 2017, 14% were extrapulmonary TB cases (EPTB); incidence rates are ranging from 8% in the Western Pacific Region to 24% in the Eastern Mediterranean Region [23]. It has been reported that pleural tuberculosis (pTB) is the most common extrapulmonary form in adults worldwide. EPTB is referred to as TB involving organs other than lungs. Independent risk factors of EPTB were reported in the literature to be mainly young age, female gender, immunogenetic background and HIV infection [18, 20].

In Morocco, the proportion of EPTB was 53% among all TB reported cases, and the diagnosis is based on clinical signs and/or histology. Of note, pTB and ganglionic TB (tuberculous lymphadenitis) are the most common forms of EPTB in Morocco [8]. Although tissue biopsy is the most effective method for EPTB diagnosis, it is invasive and sometimes inaccessible. In contrast, pleural, peritoneal, and pericardial fluids are easily accessible and provide valuable diagnostic clues in EPTB patients [12]. However, a body fluid biopsy may not exclude EPTB as atypical features may be present. Indeed, tuberculous pleural fluid is invariably an exudate, with lymphocytic predominance in about 90% of cases [3]. Usually, conventional diagnostic tests such as microscopic examination of pleural fluid, biochemical assays, mycobacterial culture from pleural liquid and histopathological examination of pleural fluid are widely used but still have limitations. Indeed, it has been reported that microscopy of the pleural fluid for acid-fast bacilli (AFB) is positive in less than 5% of tuberculous

pleurisy cases, except for HIV-infected patients and tuberculous empyema. Moreover, a mycobacterial culture of pleural fluid has also low sensitivity ranging from 24 to 58%; it is also limited by lengthy delays of up to 8 weeks to get results if solid culture media are used [1, 21]. To overcome these limitations, attention has been paid to new nucleic acid amplification (NAA) diagnostic technologies such as the polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR, owing to their rapidity, high sensitivity, and specificity. Hence, the present study aimed to evaluate the performance of *MYITS* (mycobacterial internal transcribed spacer) and *IS6110* PCR based assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains in pleural liquid compared to results generated by culture and histologic examination of pleural fluid as well as culture and to assess efficiency and practicality of the PCR based methods for MTBC detection and better management of EPTB in Morocco.

Materials and methods

Patients. A total of 50 patients suspected of having pleural effusion (PE) or had evidence of PE according to chest X-ray results and medical records, referred to Moulay Youssef university hospital in Rabat, from June 2015 to July 2016 were included in this prospective study. The study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat. Patients were informed on the objectives of the study and gave written informed consent for their participation in the present study.

Study design and sample collection. For each subject, the pleural fluid collected in a sterile tube was used for diagnosis including (i) Histology of pleural fluid; (ii) Ziehl–Neelsen (ZN) microscopy of pleural

fluid; (iii) Culture of pleural fluid for *M. tuberculosis* and (iv) PCR amplification to detect mycobacteria belonging to *Mycobacterium* genus and species belonging to *M. tuberculosis* complex. To fulfill those purposes, an aliquot of 5–10 ml of pleural fluid was submitted for cytology, biochemical testing, and histopathologic examination. An aliquot of 2 ml of the pleural fluid was centrifuged at 3,000g for 15 min, the supernatant was decanted out, and a 0.5 ml of sediments was subjected to molecular analysis. Another 2 ml of the concentrated pleural fluid was simultaneously sent to mycobacteriological laboratory for ZN staining followed by smear microscopy and mycobacterial culture on Lowenstein–Jensen medium for 4 to 8 weeks.

DNA extraction. Sediments from 0.5 ml of PE were subjected to microcentrifugation at 11,000g for 10 min and resuspension in 400 µL of distilled water. DNA was then extracted by simple boiling method for 10 minutes to release DNA [6].

Amplification of mycobacterial DNA. DNA was subjected to conventional PCR amplification by two sets of specific primers, *MYITS* and *IS6110*, to detect DNA of the members of *Mycobacterium* genus and *M. tuberculosis* complex species, respectively. The sequences and characteristics of used primers are given in Table 1.

PCR reactions were performed in a final volume of 25 µL containing 5 µl of 5X MyTaq reaction buffer (Bioline); 0.5 µl of each of 10 µM oligonucleotide primers; 1U of MyTaq DNA polymerase (Mytaq, Bioline); 16.8 µl of Nuclease free water and 2 µL of crude DNA. The reaction was subjected to a PCR protocol as follows: an initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 30 cycles each containing denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at corresponding T_m for 15 sec and extension of 72°C for 30 sec followed by a final extension at 72°C for 7 min at the end of the last cycle. For each set of analyses, a positive control (DNA of *M. tuberculosis* H37Rv) and a negative control (2 µl of PCR grade water) were included. The amplified DNA products were visualized by UV illumination after agarose gel electrophoresis and green viewer staining.

Results

Patients and pleural fluid characteristics. 50 patients enrolled in this study originated mainly from Rabat, Morocco. The demographic and clinical data showed that the mean age of patients was 34.3 years ranging from 17 to 81 years; the sex-ratio being 1.2 (28 males vs. 22 females). For pleurisy localization, 48% of patients had right side pleurisy, 42% had left side pleurisy, whereas 10% had pleurisy on both sides. The effusion was an exudate with high protein content in 90% of cases. The cytological examination revealed lymphocyte predominance in 92% of pleural effusions. Thoracentesis revealed that pleural fluid was yellow-colored in 88% of cases whereas turbid and sero-sanguinous aspects were reported each in 6% of cases.

The ZN staining smear microscopy and LJ medium culture were negative for all cases. Histological examination showed that 72% of patients had pTB (36/50), whereas 20% had inconclusive results (10/50). The histology examination was not performed for 8% of patients (4/50) because of insufficient volume of pleural fluid.

Molecular analysis by PCR using specific primers targeting *MYITS* and *IS6110* regions showed in positive cases the PCR products of 350–500 bp and 125 bp respectively. Out of 50 suspected patients with pleurisy, 34% (17/50) and 38% (19/50) were *IS6110* PCR and *MYITS* PCR-positive, respectively (Table 2). For instance, 30% of specimens were positive for both *MYITS* and *IS6110* (15/50); 4% of specimens were determined to be positive by *IS6110* but negative by *MYITS* (2/50). Of particular interest, all *IS6110* positive cases (17/50) had conventional characteristics in favor of EPTB, including clinical signs, histological results. All these patients had clinical follow-up, and consequently received anti-TB treatment. In contrast, 8% of samples were rather positive for *MYITS* and negative for *IS6110* (4/50); this result is likely to rule out pTB. For these cases, the histopathologic examination of the pleural fluid was not conclusive.

Table 1. Primers for PCR amplification

Target	Primer	Sequence	T _m	Fragment length	Reference
<i>MYITS</i>	<i>MYITS F</i>	5'-GATTGGGACGAAGTCGTAACAAG-3'	60°C	350–500 bp	[16]
	<i>MYITS R</i>	5'-AGCCTCCCACGTCCTTCATCGGCT-3'			
<i>IS6110</i>	<i>IS F</i>	5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'	65°C	123 bp	[14]
	<i>IS R</i>	5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'			

Table 2. AFB smear microscopy, LJ culture, PCR *IS6110*, and PCR *MYITS* results in suspected patients with pleural tuberculosis (n = 50)

No. of specimens	AFB smear		L/J culture		<i>MYITS</i> PCR		<i>IS6110</i> PCR		<i>MYITS</i> PCR and <i>IS6110</i> PCR	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos (%)	Neg	Pos (%)	Neg	Pos (%)	Neg
50	0	50	0	50	19 (38%)	31	17 (34%)	33	15 (30%)	35

Table 3. Comparison of PCR IS6110 results with histopathologic data

N = 50	Confirmed pTB by histologic examination (n = 36)	No conclusive exam for pTB by histologic examination (n = 14)	Total
PCR IS6110+	15	2	17
PCR IS6110-	21	12	33
Total	36	14	50
Sensitivity (%)	41.6%		
Specificity	85.7%		

Correlation between molecular and histopathological results showed that out the 36 pTB cases confirmed by histopathological examination, 15 cases were MTBC positive by PCR method targeting IS6110 in contrast to ZN staining smear microscopy and LJ culture that failed to detect positive MTBC cases (Table 2).

The efficiency of the IS6110 PCR analysis compared with the histopathological examination was estimated by the calculation of sensitivity and specificity (Table 3).

Discussion

The diagnosis of extrapulmonary infection with the MTBC is challenging because of the absence of a uniform reference standard [22]. As such, definitive and accurate diagnosis is often problematic, since the number of bacteria in extrapulmonary specimens is by far lower than the one in pulmonary specimens [10]. Furthermore, the collection of extrapulmonary material often requires invasive procedures. Moreover, it may be difficult to obtain additional samples for patient follow-up. Consequently, monitoring of treatment outcomes is difficult to establish. Recently, Pang et al. reported that the diagnosis of most of extrapulmonary TB cases relies on clinical symptoms, thus generating diagnostic delays as well as misdiagnosis of extrapulmonary TB cases [18].

The pTB is the most common etiology of pleural effusion [13]. Its diagnosis relies on ZN smear microscopy, which is albeit its low cost and speed to be performed, is not an efficient tool (sensitivity ranging from 0 to 40%) in pTB patients with the low mycobacterial load. A concentration of 10,000 AFB/ml is required to be seen on microscopy, thus, ZN smear microscopy is not an efficient tool in pTB patients with the low mycobacterial load. Moreover, this conventional technique is not able to differentiate between MTBC species and nontuberculous mycobacteria. Likewise, culture identification, although recognized as the gold standard method, has a sensitivity ranging from 0 to 80% in EPTB as 10 to 100 viable bacilli are mandatory for positivity. Additionally, mycobacterial culture takes 6 to 8 weeks to get results which causes diagnosis delays and affects clinical and therapeutic management and clinical and therapeutic decisions [15].

In the present investigation, ZN staining smear and culture did not detect any positive pTB case. These results are in agreement with those reported by Makesh Kumar et al. (2014), who found 0% sensitivity of both smear microscopy and culture identification [14]. However, other studies reported the sensitivity of culture ranging from 12 to 56% [7, 10]. Therefore, more advanced techniques for diagnosis are highly sought by clinicians and worldwide TB national control programs.

During the last decade, considerable efforts have been made towards the development of NAA tests for rapid and accurate diagnosis of pTB using different gene targets such as IS6110, GCRS and MPB-64 [15]. Of note, the IS6110 PCR is a widely used test to detect MTBC strains because of the presence of multiple copies within the MTBC genome. In the present investigation, out of 19 patients positive for MYITS, 78.9% had IS6110 in their genome. Likewise, Diraa et al. (2005) reported that 92% of MTB strains from Morocco harbored 6–14 copies of IS6110 [4]. However, in some MTBC strains, especially from Asia, there are few or zero copies of IS6110 in the genome [19], which underlines the importance of the combination of two or more gene targets either by mono or multiplex PCR to conclude for pTB.

The results from this study reported that 41.6% of confirmed pTB are due to species belonging to MTBC (15/36); this rate could increase by applying more accurate techniques for DNA extraction and by testing other target genes to reach better sensitivity. Of note, four pleural fluid specimens were positive for MYITS but negative for IS6110 meaning that those patients were infected by NTM species.

These results confirmed that molecular tests have a relatively high specificity in EPTB but lower sensitivity; thus, a positive test is treated as a pTB case whereas negative one cannot exclude the disease. This low sensitivity can be attributed to some technical constraints in nucleic acid extraction, PCR failure due to the presence of inhibitors in the pleural fluid such as host proteins, and to the paucibacillary nature of the disease.

Although NAA tests are of great value to shorten the turnaround time, they present major drawbacks and may generate either a high risk of false-positive results due to either laboratory contamination or the presence of killed or dormant bacilli in the patient specimens. Also, there is high risk of false-negative outcomes due to the paucibacillary nature of the disease, unequal distribution of acid-fast bacilli in large volume of fluids, lack of adequate clinical sample volume [5].

To enhance the sensitivity of molecular tests, real-time PCR to quantify bacterial load, reducing hands-on time and decreasing the risk of cross contamination was developed [17]. In this field, the PCR based commercially available Xpert MTB/RIF assay, allowing the identification of both *M. tuberculosis* and rifampicin resistance, was developed [2, 9].

EPTB diagnosis is crucial to timely treat patients. Like for TB, the recommended therapy for pTB is the standard 6-month regimen consisting of a two-month intensive phase of Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide, Ethambutol (RHZE), followed by a four-month continuation phase with RH [24]. Along with the drug regimen, a therapeutic thoracentesis in patients with large, symptomatic effusions should be performed. Given that pleural effusions have low microbial load, shorter regimens have been administered and had a low relapse rate [11]. Of note, drug susceptibility testing of pleural biopsy must be considered in settings where the prevalence of drug-resistant TB is high. Treatment regimens are identical to those administered for pulmonary TB.

This study highlights the need for implementing NAA techniques in EPTB management. However, it has some limitations related to the technical constraints: (i) PCR results from this study were evaluated against histopathological examination and comprehensive clinical follow-up since smear microscopy and culture were negative for all cases, (ii) the study was performed on crude DNA. To definitely conclude about the sensitivity and specificity of molecular tests, NAA techniques should be performed preferably on purified DNA, and other targets genes should be tested in combination.

Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first study aiming to diagnose TB pleural effusion in Morocco by NAA tests. In spite of its limitations, it adds to the

body of evidence on the usefulness of molecular testing as adjunct approach for accurate diagnosis and timely treatment of patients with pTB, thus allowing to avoid the emergence and spread of drug-resistant pTB. However, further efforts should be made to find the accurate method for DNA extraction from pleural fluid to increase the sensitivity of IS6110 PCR methods and to identify the best molecular targets to be helpful in clinical practice.

Acknowledgements

We would like to thank all patients for their participation. We are sincerely grateful to the clinicians and nurses of the Moulay Youssef University Hospital for their fruitful collaboration in this study.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat, and a written informed consent was obtained from each study subject.

Funding

The authors declare that no funding was received from any agency.

References

1. Aggarwal A.N., Gupta D., Jindal S.K. Diagnosis of tubercular pleural effusion. *Indian. J. Chest.*, 1999, vol. 41, no. 2, pp. 89–100.
2. Asghar M.U., Mehta S.S., Cheema H.A., Patti R., Pascal W. Sputum smear and culture-negative tuberculosis with associated pleural effusion: a diagnostic challenge. *Cureus*, 2018, vol. 10, no. 10: e3513. doi: 10.7759/cureus.3513
3. Cohen L.A., Light R.W. Tuberculous pleural effusion. *Turk. Thorac. J.*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.5152/ttd.2014.001
4. Diraa O., Elmdaghri N., Laaboudi L., Boudouma M., Gutiérrez M.C., Benbachir M. IS6110 restriction fragment length polymorphism of Mycobacterium tuberculosis isolates from an area of Casablanca, Morocco. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 2005, vol. 9, no. 11, pp. 1294–1296.
5. Galimi R. Extrapulmonary tuberculosis: tuberculous meningitis new developments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2011, vol. 15, no. 4, pp. 365–386.
6. Gholoobi A., Masoudi-Kazemabad A., Meshkat M., Meshkat Z. Comparison of culture and PCR methods for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in different clinical specimens. *Jundishapur. J. Microbiol.*, 2014, vol. 7, no. 2: e8939. doi: 10.5812/jjm.8939
7. Greco S., Girardi E., Masciangelo R., Capocetta G.B., Saltini C. Adenosine desaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 2003, vol. 7, no. 8, pp. 777–786.
8. Haddaoui H., Mrabet F.Z., Aharmin M., Bourkadi J.E. Multidrug-resistant extrapulmonary tuberculosis: about 7 cases. *Pan. Afr. Med. J.*, 2019, vol. 32: 196. doi: 10.11604/pamj.2019.32.196
9. Hillemann D., Rüscher-Gerdes S., Boehme C., Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 4, pp. 1202–1205. doi: 10.1128/JCM.02268-10
10. Jeon D. Tuberculous pleurisy: an update. *Tuberc. Respir. Dis.*, 2014, vol. 76, no. 4, pp. 153–159. doi: 10.4046/trd.2014.76.4.153
11. Jørstad M.D., Aßmus J., Marijani M., Sviland L., Mustafa T. Diagnostic delay in extrapulmonary tuberculosis and impact on patient morbidity: a study from Zanzibar. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 9: e0203593. doi: 10.1371/journal.pone.0203593
12. Lee J.Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc. Respir. Dis.*, 2015, vol. 78, no. 2, pp. 47–55. doi: 10.4046/trd.2015.78.2.47
13. Light R.W. Pleural effusion in pulmonary embolism. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, vol. 31, no. 6, pp. 716–722. doi: 10.1055/s-0030-1269832

14. Makesh Kumar V., Madhavan R., Narayanan S. Polymerase chain reaction targeting insertion sequence for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, 2014, vol. 139, no. 1, pp. 161–166.
15. Mehta P.K., Raj A., Singh N., Khuller G.K. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 66, pp. 20–36. doi: 10.1111/j.1574-695x.2012.00987.x
16. Mokaddas E., Ahmad S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from non-tuberculous mycobacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2007, vol. 60, no. 2–3, pp. 140–144.
17. Molaudzi M., Molepo J. The use of real-time polymerase chain reaction and an adenosine deaminase assay for diagnosing pleural tuberculosis. *Afr. J. Lab. Med.*, 2019, vol. 8, no. 1: 731.
18. Pang Y., An J., Shu W., Huo F., Chu N., Gao M., Qin S., Huang H., Chen X., Xu S. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008–2017. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, vol. 25, no. 3, pp. 457–464. doi: 10.3201/eid2503.180572
19. Roychowdhury T., Mandal S., Bhattacharya A. Analysis of IS6110 insertion sites provides a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 12567. doi: 10.1038/srep12567
20. Sankar M.M., Singh J., Diana S.C., Singh S. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2013, vol. 93, no. 1, pp. 75–83. doi: 10.1016/j.tube.2012.10.005
21. Seibert A.F., Haynes J. Jr., Middleton R., Bass J.B. Jr. Tuberculous pleural effusion. Twenty-year experience. *Chest*, 1991, vol. 99, no. 4, pp. 883–886.
22. Tyagi S., Sharma N., Tyagi J.S., Haldar S. Challenges in pleural tuberculosis diagnosis: existing reference standards and nucleic acid tests. *Future Microbiol.*, 2017, vol. 12, pp: 1201–1218. doi: 10.2217/fmb-2017-0028
23. WHO. Global tuberculosis Report 2018. Geneva: WHO, 2018. URL: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23553en/s23553en.pdf> (11.11.2019)
24. Zhai K., Lu Y., Shi H.Z. Tuberculous pleural effusion. *J. Thorac. Dis.*, 2016, vol. 8, no. 7, pp. E486–E494. doi: 10.21037/jtd.2016.05.87

Авторы:

Шауи И., кандидат наук, научный сотрудник отдела медико-биологических исследований департамента наук о жизни Национального центра энергетики, ядерных наук и технологий, Рабат, Марокко

Тауди С., кандидат наук, научный сотрудник отделения фтизиопульмонологии больницы им. Мулая Юссефа, Рабат, Марокко

Удгири А., кандидат наук, научный сотрудник отдела медико-биологических исследований департамента наук о жизни Национального центра энергетики, ядерных наук и технологий, Рабат, Марокко

Бенамор Д., профессор, врач-фтизиопульмонолог отделения фтизиопульмонологии Больницы им. Мулая Юссефа, Рабат, Марокко

Буркади Д., профессор, врач-фтизиопульмонолог отделения фтизиопульмонологии Больницы им. Мулая Юссефа, Рабат, Марокко

Эль Мзibri М., кандидат наук, руководитель Департамента наук о жизни Национального центра энергетики, ядерных наук и технологий, Рабат, Марокко.

Authors:

Chaoui I., PhD, Researcher, Biology and Medical Research Unit, Department of Life Sciences, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco;

Taoudi S., PhD, Researcher, Department of Pneumo-Phytisiology, Moulay Youssef Hospital, Rabat, Morocco;

Oudghiri A., PhD, Researcher, Biology and Medical Research Unit, Department of Life Sciences, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco;

Benamor J., Professor, Pneumo-Phytisiologist, Department of Pneumo-Phytisiology, Moulay Youssef Hospital, Rabat, Morocco;

Bourkadi J., Professor, Pneumo-Phytisiologist, Department of Pneumo-Phytisiology, Moulay Youssef Hospital, Rabat, Morocco;

El Mzibri M., PhD, Research Director, Head of the Life Sciences Department, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ — РЕГИОНЕ С НИЗКОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬЮ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

А.А. Вязовая¹, И.А. Лебедева², Н.Б. Ушакова², В.В. Павлов², А.А. Герасимова¹,
Н.С. Соловьева³, В.Ю. Журавлев³, О.В. Нарвская^{1,3}

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

² БУЗ ВО Вологодский областной противотуберкулезный диспансер, г. Вологда, Россия

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

Резюме. Вологодская область характеризуется относительно спокойной эпидемической ситуацией по туберкулезу в России: показатель заболеваемости туберкулезом в 2010–2018 гг. снизился с 45,2 до 15,8 на 100 тыс. населения (44,4 в Российской Федерации). Однако доля больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя выросла с 12,1% в 2016 г. до 23,7% в 2018 г. Целью исследования была характеристика генетической структуры популяции *M. tuberculosis* и выявление основных генотипов, ассоциированных с первичной МЛУ возбудителя туберкулеза в Вологодской области. Изучено 82 штамма *M. tuberculosis*, выделенных в 2018 г. от вновь выявленных больных туберкулезом. Лекарственную чувствительность определяли стандартным методом абсолютных концентраций и с помощью ВАСТЕС MGIT 960. Штаммы *M. tuberculosis* относили к генотипу Beijing и его основным подтипам, определяя специфические маркеры. Штаммы Beijing субтипировали методом MIRU-VNTR по стандартным 24 локусам, вычисляя индекс разнообразия Хантера–Гастона (HGDI). Штаммы группы non-Beijing сполитипировали. К генотипу Beijing принадлежали 62,2% (51 из 82) штаммов. Среди штаммов Beijing наиболее многочисленным был кластер Central Asian/Russian (41,5%; 34 из 82 штаммов). Доли штаммов субтипа Central Asia Outbreak (CAO) и кластера B0/W148 составили 8,5% и 7,3% соответственно. Установлена принадлежность штаммов non-Beijing к семействам T (11%; 9 из 82), LAM (11%), Haarlem (6,1%) и Ural (4,9%). Среди 82 изолятов *M. tuberculosis* выявлено 33 (40,2%) МЛУ штамма, включая 27 принадлежащих к генотипу Beijing, в том числе, к кластерам Central Asian/Russian — 18 (66,7%), B0/W148 и CAO — по 4 (14,8%). MIRU-VNTR-типирование 51 штамма Beijing выявило 22 варианта профилей (HGDI = 0,852): самые многочисленные — 94-32 (35,3%) и 95-32 (15,7%) включали штаммы Central Asian/Russian и CAO; четыре штамма B0/W148 принадлежали к кластеру 100-32. Наиболее полиморфными были локусы QUB26 и MIRU26. Впервые проведенное в Вологодской области молекулярно-генетическое исследование выявило гетерогенность популяции *M. tuberculosis*, в которой доминировали штаммы генотипа Beijing. При этом доля

Адрес для переписки:

Вязовая Анна Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-49.
E-mail: annavyazovaya@pasteurorg.ru

Contacts:

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

Для цитирования:

Вязовая А.А., Лебедева И.А., Ушакова Н.Б., Павлов В.В.,
Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В.
Молекулярно-генетический анализ популяции *Mycobacterium
tuberculosis* в Вологодской области — регионе с низкой
заболеваемостью туберкулезом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11,
№ 3. С. 497–505. doi: 10.15789/2220-7619-MAG-1545

Citation:

Vyazovaya A.A., Lebedeva I.A., Ushakova N.B., Pavlov V.V., Gerasimova A.A.,
Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V. Molecular and genetic
analysis of *Mycobacterium tuberculosis* population in the Vologda
Region with low tuberculosis incidence // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 497–505.
doi: 10.15789/2220-7619-MAG-1545

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ № 19-15-00028.

известного в России и за ее пределами эпидемиологически и клинически значимого кластера Beijing B0/W148, ассоциированного с МЛУ, составила лишь 7,3%, что значительно меньше, чем в других регионах СЗФО РФ (~19%). Вместе с тем в структуре генотипов и среди МЛУ штаммов *M. tuberculosis* преобладали представители кластера Central Asian/Russian генотипа Beijing.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, множественная лекарственная устойчивость, сполиготипирование, MIRU-VNTR, генотип Beijing, кластер Central Asian/Russian, кластер B0/W148.

MOLECULAR AND GENETIC ANALYSIS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS POPULATION IN THE VOLOGDA REGION WITH LOW TUBERCULOSIS INCIDENCE

Vyazovaya A.A.^a, Lebedeva I.A.^b, Ushakova N.B.^b, Pavlov V.V.^b, Gerasimova A.A.^a, Solovieva N.S.^c, Zhuravlev V.Yu.^c, Narvskaya O.V.^{a,c}

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

^b Tuberculosis Dispensary of the Vologda Region, Vologda, Russian Federation

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

Abstract. The Vologda Region is characterized by a relatively calm epidemic situation for tuberculosis in Russia: the incidence rate in 2010–2018 is decreased from 45.2 to 15.8 per 100 thousand of the population (44.4 in Russia). However, the proportion of patients with multiple drug resistance (MDR) of the pathogen increased from 12.1% in 2016 to 23.7% in 2018. The aim of the study was to characterize the genetic structure of the *M. tuberculosis* population and identify the main genotypes associated with the primary multidrug resistance of the pathogen in the Vologda Region. A total of 82 strains of *M. tuberculosis* isolated in 2018 from newly diagnosed tuberculosis patients were studied. Drug susceptibility testing was performed using the standard method of absolute concentration and BACTEC MGIT 960 kit. *M. tuberculosis* strains were assigned to the Beijing genotype and its main subtypes based on the analysis of specific markers. The Beijing strains were subtyped by the MIRU-VNTR method (24 standard loci), calculating the Hunter–Gaston Discriminatory Index (HGDI). Other strains of the non-Beijing group were spoligotyped. The majority of the strains were of the Beijing genotype (62.2%; 51 of 82). The most numerous cluster was Central Asian/Russian (41.5%; 34 of 82 strains). The shares of the Central Asia Outbreak (CAO) subtype and cluster B0/W148 amounted to 8.5% and 7.3%, respectively. The non-Beijing strains belonged to the genetic families T (11%; 9 of 82), LAM (11%), Haarlem (6.1%), and Ural (4.9%). Among 82 *M. tuberculosis* isolates, 33 (40.2%) MDR strains were identified, counting 27 of the Beijing genotype, including those of the Central Asian/Russian — 18 (66.7%), B0/W148 and CAO — 4 each (14.8%) clusters. MIRU-VNTR typing of 51 Beijing strains revealed 22 profiles (HGDI = 0.852); the largest clusters were 94-32 (35.3%) and 95-32 (15.7%), which included strains Central Asian/Russian and CAO. Four strains of genotype B0/W148 belonged to cluster 100-32. The loci QUB26 (HGDI = 0.493) and MIRU26 (HGDI = 0.388) had the highest polymorphism. For the first time, a molecular genetic study carried out in the Vologda region revealed the heterogeneity of the *M. tuberculosis* population with strains of the Beijing genotype dominated. At the same time, the share of the associated with MDR, epidemiologically and clinically significant cluster Beijing B0/W148, well defined in Russia and abroad, was only 7.3%, which is significantly less than in other regions of the Northwestern Federal District of the Russian Federation (~19%). Concurrent, representatives of the Central Asian/Russian cluster of the Beijing genotype prevailed in the structure of genotypes and among MDR *M. tuberculosis* strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, multiple drug resistance, spoligotyping, MIRU-VNTR, Beijing genotype, cluster Central Asian/Russian, cluster B0/W148.

Введение

Вологодская область по численности населения (1 167 713 чел. на 2019 г.) — крупнейший, после Санкт-Петербурга и Ленинградской области, регион Северо-Западного федерального округа (СЗФО) Российской Федерации (РФ). Площадь области — 144 527 км²; административный центр — город Вологда (311 846 чел.). Область граничит с восемью субъектами РФ: Архангельской областью на севере, Кировской — на востоке, Костромской и Ярославской — на юге, Тверской и Новгородской — на юго-западе, Ленинградской — на западе и Республикой Карелия — на северо-западе. Вологодская область характеризуется относительно спокой-

ной эпидемической ситуацией по туберкулезу (ТБ) в СЗФО и входит в число семи сравнительно благополучных регионов РФ. Показатель заболеваемости ТБ общего населения области за период 2010–2018 гг. снизился с 45,2 до 15,8 (28,6 по СЗФО; 44,4 по РФ) на 100 тыс. населения [5]. При этом заболеваемость ТБ постоянного населения также уменьшилась до 13,2 на 100 тыс. в 2018 г. (25,7 по СЗФО). В целом заболеваемость ТБ за 2018 г. сократилась на 26%, а смертность — на 14%. Однако отмечен рост доли инфицированных ВИЧ с 7,1% в 2017 г. до 9,6% в 2018 г. (20,9% и 23,1% по РФ) среди впервые выявленных больных ТБ постоянных жителей Вологодской области и рост заболеваемости ТБ больных с коинфекцией — 1,2 против

1,3 (8,3 и 8,5 по РФ) на 100 тыс. соответственно. В структуре впервые выявленного ТБ увеличилась доля больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) с 12,1% в 2016 г. до 23,7% (35,1% в 2018 г. (30,4% по СЗФО, 31,9 % по РФ) [5].

В структуре впервые выявленных бактериовыделителей при ТБ органов дыхания увеличилась доля больных МЛУ-ТБ с 28,4% в 2017 г. до 34,6% в 2018 г. (31,6% по СЗФО, 32,2% по РФ) [5]. Среди причин роста МЛУ-ТБ в РФ отмечают широкое распространение штаммов *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства (линии, lineage) Beijing, в частности его основных кластеров — Central Asian/Russian (Центрально-Азиатский/Российский, СС1, также именуемый «кластер 94-32») и B0/W148 (СС2) [3, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15]. Неоднородный Central Asian/Russian кластер включает распространенный в Средней Азии, ассоциированный с устойчивостью к ПТП эпидемиологически значимый субтип CAO (англ. Central Asia Outbreak — Центрально-Азиатская вспышка), выявляемый и в России [8, 12].

В ряде регионов СЗФО доля штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing у впервые выявленных больных ТБ составляла 45–63% [1, 2, 11, 15]. По Вологодской области информация о распространенности генетических семейств возбудителя туберкулеза отсутствует, поскольку популяционные исследования *M. tuberculosis* на данной территории до настоящего времени не проводились.

Целью исследования была характеристика генетической структуры популяции *M. tuberculosis* и выявление основных генотипов, ассоциированных с первичной МЛУ возбудителя туберкулеза в Вологодской области.

Материалы и методы

Согласно официальным данным, с марта 2018 г. по март 2019 г. в Вологодской области был выявлен 161 больной ТБ (156 случаев — туберкулез легких, 4 — туберкулез плевры, 1 — внелегочный туберкулез), из них 110 бактериовыделителей. Критериями включения в исследование стали впервые выявленный туберкулез, возраст старше 18 лет, постоянное проживание в регионе, наличие культуры *M. tuberculosis*. Нами изучены 82 изолята *M. tuberculosis*, впервые полученных от бактериовыделителей (в том числе от 9 больных ВИЧ/ТБ), — 51 (62,2%) мужчины и 31 женщины. Культивирование клинического материала осуществляли с использованием стандартных методов; определение лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* к ПТП проводили методом абсолютных кон-

центраций на плотных питательных средах и/или методом пропорций на жидкой питательной среде в системе Bactec MGIT 960 (приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 г. № 109).

При наличии устойчивости к одному из ПТП (стрептомицину) штаммы *M. tuberculosis* считали монорезистентными, к двум препаратам (стрептомицину и изониазиду) — полирезистентными, одновременно устойчивые к рифампицину и изониазиду — мультирезистентными (МЛУ) (приказ Минздрава РФ № 951, ред. от 29.10.2014).

Выделение ДНК из чистых культур *M. tuberculosis*, выявление генотипа Beijing (включая кластеры B0/W148 и Central Asian/Russian, CAO), дифференциацию современной и древней сублиний генотипа Beijing, MIRU-VNTR-типирование по 24 локусам и сполиготипирование проводили как описано ранее [15]. Полученные сполигографы сопоставляли с профилями из международной базы SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>) и определяли сполиготип — SIT (Spoligotype International Type).

Число повторов в каждом локусе MIRU-VNTR — числовой профиль штамма — сравнивали с профилями в международной базе данных MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>) и находили MIRU-VNTR-тип согласно номенклатуре (MLVA Mtbc 15-9). Построение филогенетического древа для оценки родства штаммов осуществляли методом невзвешенной попарной группировки с усреднением (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages, UPGMA). Для оценки аллельного полиморфизма локусов и дискриминирующей способности MIRU-VNTR-типирования рассчитывали индекс разнообразия Хантера–Гастона (HGDI, Hunter–Gaston Discriminatory Index) [15].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Excel и ресурса «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>), вычисляя значения критерия хи-квадрат Пирсона (для степеней свободы, f), точного критерия Фишера с помощью четырехпольных таблиц или произвольных таблиц сопряженности и отношения шансов (ОШ). Различия между группами считали статистически значимыми при доверительном интервале (ДИ) 95 % и $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Из 82 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных ТБ в Вологодской области, 34 (41,5%) были лекарственно-чувствительными (ЛЧ), 15 (18,3%) — моно- и полирезистентными. МЛУ обладали 33 (40,2%) штамма. Все МЛУ-штаммы, за исключением одного, проявляли устойчивость к стрептомицину; 72,7% (24 из 33) штаммов были резистент-

Таблица 1. Генотипы и лекарственная устойчивость штаммов *M. tuberculosis*

Table 1. Genotypes and drug resistance of *M. tuberculosis* strains

Генотип Genotype	ЛЧ Sensitive n = 34	М/П* M/P* n = 15	МЛУ MDR n = 33	Всего Total n = 82
Beijing	14	10	27	51
B0/W148	0	2	4	6
Central Asian/Russian	11	5	18	34
Central Asia Outbreak (CAO)	0	3	4	7
Другой/Other	2	0	1	3
Древний/Ancient	1	0	0	1
Non-Beijing	20	5	6	31
T	6	1	0	7
LAM	7	2	2	11
Ural	2	0	2	4
Haarlem	2	1	2	5
Unknown	3	1	0	4

Примечание. * Моно-/полирезистентный.
Note. Mono-/polyresistant.

ны к этамбутолу, 18,2% — к пиразинамиду. Устойчивостью к инъекционным ПТП — канамицину и капреомицину — обладали 45,5 и 9,1% штаммов соответственно. Доля МЛУ-штаммов у больных ВИЧ+/ТБ (77,8%; 7 из 9) значительно превышала таковую у ВИЧ-отрицательных больных ТБ (35,6%; 26 из 73) (p < 0,05).

Установлена принадлежность 62,2% (51 из 82) штаммов *M. tuberculosis* к генотипу Beijing (табл. 1), что сопоставимо с данными по Калининградской области (63,0%) [1]. Для сравнения: в среднем по СЗФО доля генотипа Beijing в разные периоды составляла около 50,0% [2, 11, 15].

Штаммы генотипа Beijing, за исключением одного ЛЧ, относились к современной сублинии, преобладающей в российской популяции *M. tuberculosis* [10]. Как видно из табл. 1, наиболее многочисленным был кластер Central Asian/Russian (41,5%; 34 из 82 штаммов). Доля субтипа CAO в исследуемой выборке составила 8,5% (7 из 82), что превышало значение данного показателя в Омской области (3,8%; 5 из 131)

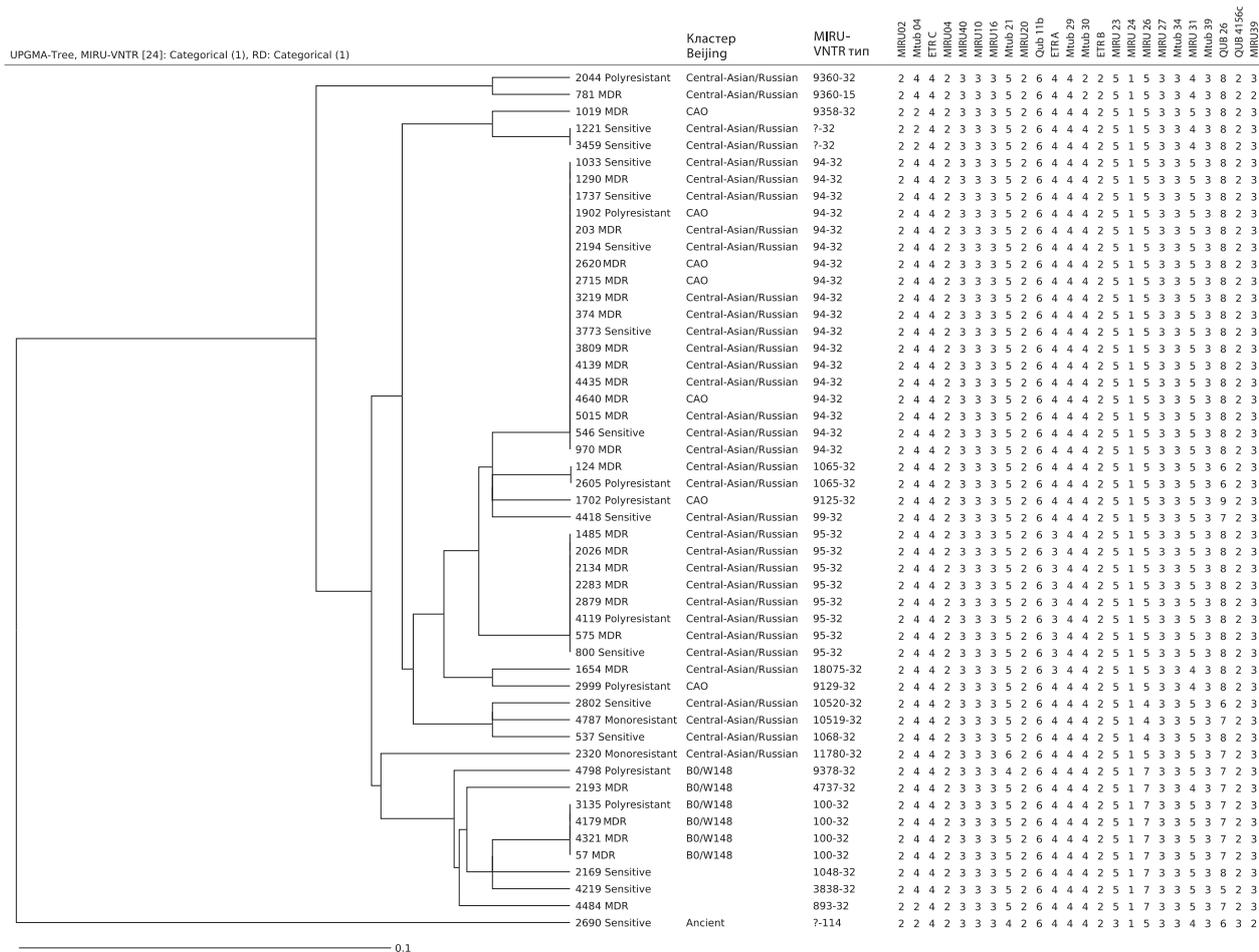


Рисунок 1. Дендрограмма на основе профилей 24 локусов MIRU-VNTR штаммов Beijing *M. tuberculosis*
Figure 1. The dendrogram plotted by using 24 MIRU-VNTR loci of *M. tuberculosis* Beijing strains

Примечание. Для каждого штамма указаны номер и отношение к ПТП (Sensitive — ЛЧ, Mono-resistant — монорезистентность, Polyresistant — полирезистентность, MDR — МЛУ).
Note. Strain number, drug resistance profile (Sensitive, Mono-resistant, Polyresistant, MDR) are depicted in box.

LAM включало девять (11%) штаммов, из них два обладали МЛУ. Штаммы генотипа Ural (4,9%; 4) были представлены лишь одним сполитотипом — SIT262, и, как видно из таблицы 2, два штамма проявляли МЛУ. Семейство Haarlem представлено пятью (6,1%) штаммами, в том числе двумя МЛУ-штаммами (SIT50 и SIT511). Сравнимые значения частоты встречаемости генотипов T (14 и 15%), LAM (10 и 12%) и Haarlem (5 и 4%) наблюдали в Республиках Карелия и Коми, генотипа Ural (6 и 7%) — в Калининградской области и Республике Коми соответственно [1, 2, 15].

Доля МЛУ штаммов non-Beijing составила 7,3% (6 из 82) (табл. 1), что близко к показателю по Калининградской области (9,6%, 7 из 73; $p = 0,611$) и Республике Карелия (10,3%, 7 из 78; $p = 0,702$) и незначительно превышает показатель по Республике Коми (3,8%, 5 из 130; $p =$

0,268) [1, 2, 15]. Доли устойчивых к этамбутолу МЛУ-штаммов Beijing (81,5%; 22 из 27) и non-Beijing (33,3%; 2 из 6) существенно различались ($p < 0,05$).

С учетом выявленных различий между группами Beijing и non-Beijing штаммов *M. tuberculosis* был проведен анализ клинико-эпидемиологических данных пациентов (табл. 3). В обеих группах преобладали мужчины (суммарно 62,2%), что в целом отражает статистику заболеваемости туберкулезом мужчин в России (67,8%) [5]. Однако статистически значимой связи между полом пациентов и генотипом возбудителя не обнаружено (табл. 3). Средний возраст инфицированных возбудителем генотипа Beijing составил 42,8 года против non-Beijing 47 лет. Выявлена статистически значимая связь между возрастом пациентов и генотипом возбудителя ($\chi^2 = 8,417$ при $f = 3$; $p = 0,039$). При этом

Таблица 3. Характеристика больных туберкулезом, вызванным штаммами *M. tuberculosis* генотипа Beijing и non-Beijing

Table 3. Characteristics of patients with tuberculosis caused by *M. tuberculosis* strains of Beijing and non-Beijing genotypes

Характеристика Characteristics	Beijing N, абс./ abs. (%)	non-Beijing N, абс./ abs. (%)	χ^2	Уровень значимости p-value	ОШ OR	95% ДИ 95% CI
Всего/Total	51 (100)	31 (100)				
Пол/Sex						
мужчины/males	29 (56,9)	22 (71,0)	1,631	0,202	0,54	0,21–1,40
женщины/females	22 (43,1)	9 (29,0)				
Средний возраст, лет/Median age, years						
мужчины/males	43,6±12,6	48,3±9,4				
женщины/females	41,6±11,8	43,7±6,4				
Возрастные группы, лет/Age groups, years						
18–34	18 (35,3)	3 (9,7)	6,641	0,010	5,091	1,357–19,095
35–44	10 (19,6)	13 (41,9)	4,763	0,030	0,338	0,125–0,912
45–54	11 (21,6)	7 (22,6)	0,012	0,915		
55 и старше/55 and older	12 (23,5)	8 (25,8)	0,054	0,816		
Место проживания/Residence						
городские жители/urban	32 (62,7)	18 (58,1)	0,178	0,674	1,216	0,489–3,027
сельские жители/rural	19 (37,3)	13 (41,9)				
ВИЧ+/HIV+	8 (15,7)	1 (3,2)	0,142*	> 0,05	5,581	0,663–46,992
Клинические формы туберкулеза/Clinical forms of tuberculosis						
инфильтративный туберкулез легких infiltrative pulmonary tuberculosis	27 (52,9)	15 (48,4)	0,160	0,690		
диссеминированный туберкулез легких disseminated pulmonary tuberculosis	11 (21,6)	8 (25,8)	0,195	0,660		
очаговый туберкулез легких focal pulmonary tuberculosis	3 (5,9)	2 (6,5)	0,138*	0,711		
фиброзно-кавернозный туберкулез cavernous tuberculosis	2 (3,9)	0	0,524*	> 0,05		
генерализованный туберкулез generalised tuberculosis	2 (3,9)	1 (3,2)	0,361*	> 0,05		
прочие other	6 (11,8)	5 (16,1)	0,316	0,574		

Примечание. * — точный критерий Фишера (двусторонний).
Note. Fisher exact test (two tailed).

значимые различия выявлены в возрастных группах 18–34 (чаще встречался генотип Beijing) и 35–44 (чаще встречались другие генотипы — non-Beijing) (табл. 3). Лица данного возраста принадлежат к группе трудоспособного и наиболее социально активного населения, что повышает риск распространения туберкулеза.

В 2018 г. среди впервые выявленных больных ТБ из числа постоянных жителей Вологодской области доля ВИЧ-положительных составила 9,6% [5]. В нашем исследовании доля зараженных ВИЧ среди пациентов, инфицированных возбудителем генотипа Beijing, составила 15,7% против 3,2% в группе инфицированных другими генотипами (non-Beijing) возбудителя. Среди клинических диагнозов в обеих группах чаще встречались инфильтративный и диссеминированный туберкулез легких. Связь между клинической формой туберкулеза, ВИЧ статусом

пациентов и генотипом возбудителя (Beijing или non-Beijing) статистически не значима ($p > 0,05$) (табл. 3).

Далее был проведен анализ распределения основных генотипов возбудителя у больных туберкулезом на территориях в Вологодской области (рис. 2): на северо-западе ($n = 11$), юго-западе ($n = 17$), в центральной части ($n = 11$), на востоке ($n = 10$). Отдельно оценивали структуру генотипов *M. tuberculosis* больных ТБ, проживающих в Вологде ($n = 33$). Как видно на рис. 2, штаммы генотипа Beijing преобладали на всех территориях, однако их доля была больше на северо-западе, нежели в других районах Вологодской области. Распределение штаммов Beijing кластера Central Asian/Russian по территории области было относительно равномерным.

Штаммы кластера B0/W148 и субтипа CAO кластера Central Asian/Russian (по 18,2%) гено-

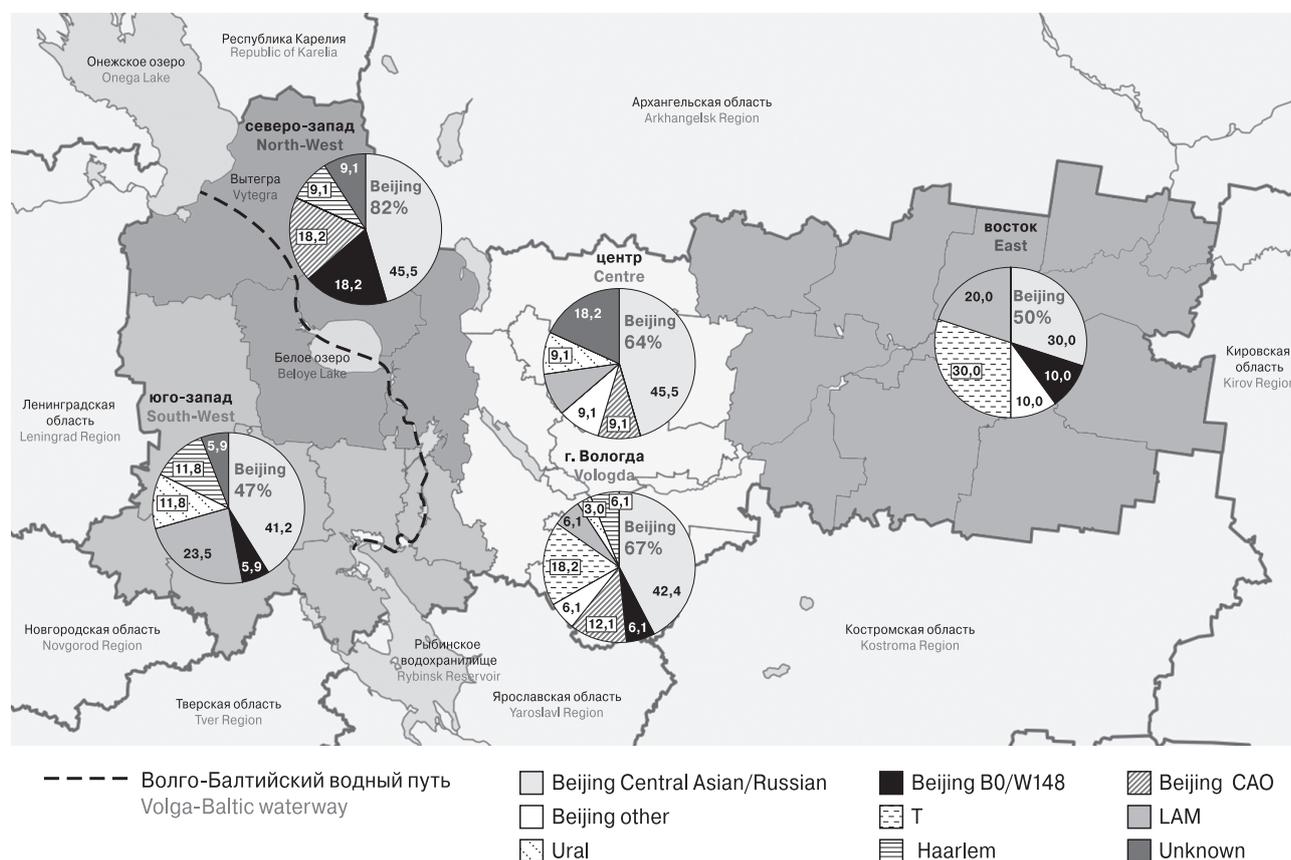


Рисунок 2. Генотипы *M. tuberculosis* в Вологодской области

Figure 2. Genotypes of *M. tuberculosis* identified in the Vologda Region

Примечания. Северо-запад области включали Вытегорский, Белозерский, Вашкинский и Кирилловский районы; юго-запад — Чагодощенский, Устюженский, Кадуйский, Череповецкий, Бабаевский и Шекснинский районы; центральная часть — Вологодский, Усть-Кубинский, Вожегодский, Харовский, Сямженский, Сокольский, Междуреченский и Грязовецкий районы; восток — Верховажский, Тотемский, Бабушкинский, Тарногский, Нюксенский, Великоустюгский, Кичменгско-Городецкий и Никольский районы.

Notes. The North-West of the Region consisted of Vytegor'sky, Belozersky, Vashkinsky and Kirillovsky Districts; South-West — Chagodoshchensky, Ustyuzhensky, Kaduysky, Cherepovets, Babaevsky and Sheksninsky Districts; the central part — Vologda District, Ust-Kubinsky, Vozhegodsky, Kharovsky, Syamzhensky, Sokolsky, Mezhdurechensky and Gryazovets Districts; East — Verkhovazhsky, Totemsky, Babushkinsky, Tarnogsky, Nyuksensky, Velikoustyugsky, Kichmengo-Gorodetsky and Nikolsky Districts.

типа Beijing преимущественно были выделены в северо-западных районах области (рис. 2). Данная территория отличается развитой транспортной инфраструктурой: именно здесь проходит обеспечивающий коммуникацию Волго-Балтийский водный путь (объединяет в единую систему воды Балтийского, Белого, Каспийского, Азовского и Черного морей), что может способствовать распространению определенных вариантов возбудителя туберкулеза.

Согласно гипотезе появления штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing на территории бывшего СССР, первоначально штаммы данного генотипа были занесены из Китая работниками Китайско-Восточной железной дороги, а затем получили распространение в исправительно-трудовых лагерях (ИТЛ) системы ГУЛАГ и среди гражданского населения СССР [6]. В Вологодской области самым крупным являлся Вытегорский ИТЛ (Вытегорлаг, дислоцировался в г. Вытегра) (1948–1952 гг.), контингент которого был привлечен к строительству Волго-Балтийского водного пути на участке «озеро Онежское — озеро Белое» [4]. Это отчасти объясняет циркуляцию штаммов генотипа Beijing в целом, а также кластера B0/W148 и субтипа CAO кластера Central Asian/Russian на северо-западе Вологодской области в современных условиях.

В структуре *M. tuberculosis* группы non-Beijing распределение штаммов других генетических семейств также имело свои особенности. Популяции *M. tuberculosis* Вологды и юго-запада области оказались неоднородными; штаммы

семейства T были обнаружены только на востоке области и в Вологде (рис. 2).

Отмеченные тенденции в географическом распределении генотипов *M. tuberculosis* в Вологодской области следует интерпретировать с осторожностью из-за небольшого размера выборки, относительно короткого периода наблюдения (1 год) и неполноты эпидемиологической характеристики случаев заболевания.

Заключение

Впервые проведенное в Вологодской области молекулярно-генетическое исследование возбудителя ТБ позволило выявить гетерогенность популяции *M. tuberculosis*, в которой более половины (62%) штаммов принадлежали к генотипу Beijing. При этом доля распространенного в России и за ее пределами кластера Beijing B0/W148, ассоциированного с МЛУ, составила лишь 7,3%, что значительно меньше, чем в других регионах СЗФО РФ (~19%). Вместе с тем в структуре генотипов и среди МЛУ-штаммов *M. tuberculosis* преобладали представители кластера Central Asian/Russian генотипа Beijing.

Представленные данные могут послужить основой для разработки методологии молекулярно-генетического мониторинга популяции *M. tuberculosis* в целях совершенствования контроля распространения эпидемиологически и клинически значимых вариантов возбудителя туберкулеза в Вологодской области и других регионах Северо-Запада России.

Список литературы/References

1. Военнопленные в СССР. 1936–1956. Том 6. Лагеря для военнопленных НКВД-МВД СССР (1939–1956) / под ред. М.М. Загоруйко. *Волгоград, 2013. 766 с.* [War prisoners in the USSR. 1936–1956. Volume 6. Penitentiary camps for prisoners of war of the NKVD-Ministry of Internal Affairs of the USSR (1939–1956). *Volgograd, 2013. 766 p. (In Russ.)*]
2. Вязовая А.А., Ахмедова Г.М., Соловьева Н.С., Герасимова А.А., Старкова Д.А., Туркин Е.Н., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В., Мокроусов И.В. Молекулярная эпидемиология туберкулеза в Калининградской области России: 10 лет спустя // *Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 367–374.* [Vyazovaya A.A., Akhmedova G.M., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Starkova D.A., Turkin E.N., Zhuravlev V.Y., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Kaliningrad region of Russia: 10 years after. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 367–374. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-367-374]
3. Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Сунчалина Т.В., Мокроусов И.В., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В. Характеристика популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Карелия // *Туберкулез и болезни легких. 2016. № 8. С. 48–53.* [Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Sunchalina T.V., Mokrousov I.V., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V. Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* population in Republic of Karelia. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases, 2016, no. 8, pp. 48–53. (In Russ.)* doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-8-48-53]
4. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Синьков В.В., Хромова П.А., Орлова Е.А., Кошечев М.Е., Савилов Е.Д. Эпидемиологическое обоснование распространения основных клонов генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis* в Иркутской области // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 6. С. 88–94.* [Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Khromova P.A., Orlova E.A., Koshcheev M.E., Savilov E.D. Epidemiological study of main clones distribution genotype Beijing of *Mycobacterium tuberculosis* within Irkutsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology, 2017, no. 6, pp. 88–94. (In Russ.)* doi: 10.36233/0372-9311-2017-6-88-94]
5. Ресурсы и деятельность противотуберкулезных организаций Российской Федерации в 2017–2018 гг. (статистические материалы). М.: РИО ЦНИИОИЗ, 2019. 101 с. [Resources and activities of anti-tuberculosis organizations of the Russian Federation in 2017–2018 (statistical materials). М.: RIO TSNIOIZ, 2019. 101 p. (In Russ.)]
6. Синьков В.В., Огарков О.Б., Савилов Е.Д. Реконструкция эпидемической истории «пекинского генотипа» *Mycobacterium tuberculosis* в России и странах бывшего СССР по результатам сполитипирования // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. № 3. С. 25–29.* [Sinkov V.V., Ogarkov O.B., Savilov E.D. Reconstruction of the epidemic his-

- tory of the Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Russia and Former Soviet Countries using spoligotyping. *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija = Molecular Genetics Microbiology and Virology*, 2011, no. 3, pp. 25–29. (In Russ.)]
7. Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И., Вязовая А.А., Нарвская О.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Уральского региона России // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 21–28. [Umpeleva T.V., Kravchenko M.A., Eremeeva N.I., Vyazovaya A.A., Narvskaya O.V. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the Ural region, Russia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 21–28. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-21-28
 8. Merker M., Barbier M., Cox H., Rasigade J.P., Feuerriegel S., Kohl T.A., Diel R., Borrell S., Gagneux S., Nikolayevskyy V., Andres S., Nübel U., Supply P., Wirth T., Niemann S. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia. *eLife*, 2018, no. 7: e38200. doi: 10.7554/eLife.38200
 9. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg, N., Lecher S., Willery E., Blum M.G., Rüscher-Gerdes S., Mokrousov I., Aleksic E., Allix-Béguec C., Antierens A., Augustynowicz-Kopeć E., Ballif M., Barletta F., Beck H.P., Barry C.E. the 3rd, Bonnet M., Borroni E., Campos-Herrero I., Wirth T. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nature Genetics*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 242–249. doi: 10.1038/ng.3195
 10. Mokrousov I., Ly H.M., Otten T., Lan N.N., Vyshnevskiy B., Hoffner S., Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res.*, 2005, vol. 15, no. 10, pp. 1357–1364. doi: 10.1101/gr.3840605
 11. Narvskaya O., Mokrousov I., Otten T., Vishnevsky B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia. In: Trends in DNA Fingerprinting Research. Ed. by M.M. Read. *New York: Nova Science Publishers*, 2005, pp. 111–125.
 12. Shitikov E., Vyazovaya A., Malakhova M., Guliaev A., Bespyatykh J., Proshina E., Pasechnik O., Mokrousov I. Simple assay for detection of the Central Asia outbreak clade of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype. *J. Clin. Microbiol.*, 2019, vol. 57, no. 7: e00215-19. doi: 10.1128/JCM.00215-19
 13. Umpeleva T., Belousova K., Golubeva L., Boteva T., Morozova I., Vyazovaya A., Mokrousov I., Eremeeva N., Vakhrusheva D. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* in the “closed” Russian town with limited population migration. *Infect. Genet. Evol.*, 2020, no. 79: 104174. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104174
 14. Vyazovaya A., Mokrousov I., Solovieva N., Mushkin A., Manicheva O., Vishnevsky B., Zhuravlev V., Narvskaya O. Tuberculous spondylitis in Russia and prominent role of multidrug-resistant clone *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 4, pp. 2349–2357. doi: 10.1128/AAC.04221-14
 15. Vyazovaya A., Proshina E., Gerasimova A., Avadenii I., Solovieva N., Zhuravlev V., Narvskaya O., Mokrousov I. Increased transmissibility of Russian successful strain Beijing B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis*: Indirect clues from history and demographics. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2020, vol. 122: 101937. doi: 10.1016/j.tube.2020.101937

Авторы:

Вязовая А.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Лебедева И.А., зав. клинико-диагностической лабораторией БУЗ ВО Вологодский областной противотуберкулезный диспансер, г. Вологда, Россия;
Ушакова Н.Б., зам. главного врача по медицинской части БУЗ ВО Вологодский областной противотуберкулезный диспансер, г. Вологда, Россия;
Павлов В.В., главный врач БУЗ ВО Вологодский областной противотуберкулезный диспансер, г. Вологда, Россия;
Герасимова А.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Соловьева Н.С., к.м.н., зав. бактериологической лабораторией Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;
Журавлев В.Ю., к.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;
Нарвская О.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; научный консультант ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Vyazovaya A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Lebedeva I.A., Head of the Laboratory of Clinical Diagnostics, Tuberculosis Dispensary of the Vologda Region, Vologda, Russian Federation;
Ushakova N.B., Deputy of Chief Medical Officer, Tuberculosis Dispensary of the Vologda Region, Vologda, Russian Federation;
Pavlov V.V., Head Physician, Tuberculosis Dispensary of the Vologda Region, Vologda, Russian Federation;
Gerasimova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Solovieva N.S., PhD (Medicine), Head of the Bacteriological Laboratory, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Zhuravlev V.Yu., PhD (Medicine), Head of the Department of the Laboratory Diagnostics, Research Institute of Phthisiopulmonology, 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 17.07.2020
 Отправлена на доработку 10.12.2020
 Принята к печати 30.12.2020

Received 17.07.2020
 Revision received 10.12.2020
 Accepted 30.12.2020

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБАПЕНЕМ- УСТОЙЧИВОГО ШТАММА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KP254 КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ВЕТКИ ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ

А.Е. Алексеева, Н.Ф. Бруснигина, Н.А. Гординская

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

Резюме. На основании результатов полногеномного секвенирования дана молекулярно-генетическая характеристика клинического штамма *Klebsiella pneumoniae* KP254, принадлежащего к клональной группе 23. Известно, что представители данной клональной группы могут обладать высокой вирулентностью и являться возбудителями внебольничных инфекций. Фенотипически штамм *K. pneumoniae* KP254 характеризуется множественной лекарственной устойчивостью, включая карбапенемы. В структуре хромосомы обнаружены детерминанты антибиотикорезистентности (*bla*_{SHV-1}, *oqxAB*, *fosA*) и патогенности, кодирующие фимбрии 1 и 3 типов и синтез белка-сидерофора иерсинеобактина. Установлено отсутствие конъюгативного элемента ICEKp1, острова патогенности KPNPI208, а также генов аллантаинового регулона, которыми часто обладают высоковирулентные штаммы. Анализ нуклеотидных последовательностей *in silico* позволил выявить репликоны плазмид групп несовместимости FII, FIA_{НИИ}/FII_К, Col₄₄₀₁, Col_{pVC}, FIB_К, FII_{pCRY}. В результате объединения контигов относительно референсных последовательностей с использованием сервиса BLASTN определено наличие предположительно двух плазмид антибиотикорезистентности IncFII и IncFII_{pCRY} и одной плазмиды вирулентности IncFIB_К. В структуру плазмиды вирулентности входят детерминанты белка-сидерофора аэробактина, регулятора мукоидного фенотипа RmpA₂, а также гены устойчивости к тяжелым металлам. Покрытие нуклеотидной последовательности плазмиды вирулентности составило 93% относительно плазмиды вирулентности pK2044 с уровнем идентичности 99,38%, делетированными оказались области, ответственные за синтез сальмохелина и белка RmpA. Набор детерминант антибиотикорезистентности, выявленных в структуре мобилома, включает гены бета-лактамазы LAP-2 (плазмида IncFII_{pCRY}) — аналога TEM-1, — а также бета-лактамазы расширенного спектра CTX-X-55 (плазмида IncFII). Обе детерминанты являются редко регистрируемыми на территории Российской Федерации. Дополнительно в составе плазмидной ДНК обнаружены широко распространенные гены *bla*_{OXA-1}, *aac(3')*-IIa, *ΔcatB4*, *aac(6')*-Ib-cr, *tet(A)*, *qnrS1*, *sul2*, *catA2*. В структуре резистоста отсутствуют гены карбапенемаз, в то время как исследуемый штамм обладает устойчивостью

Адрес для переписки:

Алексеева Анна Евгеньевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 432-87-91. Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Contacts:

Anna E. Alekseeva
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Blokhina I.N. Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod.
Phone: +7 (831) 432-87-91. Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Для цитирования:

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика карбапенем-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae* KP254 как представителя эволюционной ветки высоковирулентных штаммов // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 506–516. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-1480

Citation:

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A. Molecular genetic characteristics of the carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* KP254 strain as a representative of the highly virulent strain evolutionary branch // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 506–516. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-1480

к карбапенемам. В результате анализа транслированных последовательностей генов пориновых белков OmpK35 и OmpK36 обнаружены мутационные изменения, которые привели к формированию стоп-кодона в гене *ompK35*. Также установлено, что аминокислотная последовательность OmpK36 содержит большое количество замен, вставок и делеций. Наличие подобных изменений является одним из факторов, определяющих устойчивость к карбапенемам. Синергетический эффект может оказывать активность эффлюксных насосов, присутствующих в структуре генома *K. pneumoniae* KP254, в частности AcrAB-TolC и KpnEF. Таким образом, у исследуемого штамма наблюдается сохранение наиболее значимых признаков, характерных для представителей эволюционной ветки высоковирулентных штаммов клебсиелл, и в тоже время приобретение генетических детерминант множественной лекарственной устойчивости.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, сиквенс-тип 23, CTX-M-55, LAP-2, детерминанты резистентности и патогенности, плазмиды, вирулентность, порины.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF THE CARBAPENEM RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KP254 STRAIN AS A REPRESENTATIVE OF THE HIGHLY VIRULENT STRAIN EVOLUTIONARY BRANCH

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A.

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

Abstract. Here we provide molecular and genetic characteristics of the *Klebsiella pneumoniae* KP254 clinical strain belonging to clonal group 23 based on the genome-wide sequencing data. It is known that representatives of such clonal group exert highly virulent properties and cause community-acquired infections. Phenotypically, *K. pneumoniae* KP254 strain is characterized by multidrug resistance, including carbapenems. The determinants of antibiotic resistance (*bla*_{SHV-1}, *oqxAB*, *fosA*) and pathogenicity encoding fimbriae 1, 3 types and the siderophore yersineobactin synthesis were found in the chromosome structure. However, there was uncovered the lack of conjugative element ICEKp1, the pathogenicity island KPHP1208, and the allantoin regulon genes which are often found in highly virulent strains. Analyzing nucleotide sequences *in silico* allowed to reveal the replicons of incompatibility group plasmids for FII, FIA_{HII}/FII_K, Col₄₄₀₁, Col_{PVC}, FIB_K, FII_{PCRY}. Combining contigs relative to reference sequences by using the BLASTN service allowed to identify two putative antibiotic resistance plasmids IncFII and IncFII_{PCRY} as well as one virulence plasmid IncFIB_K. The determinants of the aerobactin siderophore, the RmpA₂ mucoid phenotype regulator as well as heavy metal resistance genes constitute the virulence plasmid structure. The virulence plasmid nucleotide sequence coverage comprised 93% relative to the virulence plasmid pK2044 with 99.38% identity level; the genomic regions responsible for the salmochelin and RmpA protein synthesis were deleted. The set of antibiotic resistance determinants identified in the mobilome structure includes the genes for beta-lactamase LAP-2 (IncFII_{PCRY} plasmid) — a TEM-1 analogue, as well as extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-55 (IncFII plasmid), both of which are rarely recorded in the Russian Federation. Additionally, widespread genes *bla*_{OXA-1}, *aac*(3')-IIa, *ΔcatB4*, *aac*(6')-Ib-cr, *tet*(A), *qnrS1*, *sul2*, *catA2* were also found in the plasmid DNA. The carbapenemase genes are absent in the resistome structure, whereas the examined strain exerts carbapenem resistance. The analysis of the *ompK35* and *ompK36* porin gene translated sequences revealed mutational changes which resulted in emerged stop codon within the *ompK35* gene, whereas OmpK36 amino acid sequence contains a large number of substitutions, insertions, and deletions. The changes identified serve as one of the factors determining the carbapenem resistance. A synergistic effect may be accounted for by activity of the efflux pumps found in the structure of the *K. pneumoniae* KP254 genome, particularly AcrAB-TolC and KpnEF. Thus, the strain examined by us preserves the most significant signs specific to the highly virulent evolutionary branch *Klebsiella* strains, and at the same time, acquires the multidrug resistance genetic determinants.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, sequence type 23, CTX-M-55, LAP-2, determinants of resistance and pathogenicity, plasmids, virulence, porins.

Введение

Известно, что бактерии вида *Klebsiella pneumoniae* относятся к группе условно-патогенных микроорганизмов и являются представителями нормофлоры организма человека. Однако в настоящее время штаммы *Klebsiella pneumoniae*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), занимают

одно из лидирующих мест в этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и включены в группу ESCAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp.) как представляющие наибольшую опасность для здравоохранения [2, 5, 10, 11, 24, 28, 35]. Нужно отметить, что *Klebsiella pneumoniae*

являются возбудителями не только нозокомиальных, но и внебольничных инфекционных заболеваний, таких как пневмония, гнойный абсцесс печени, воспаления урогенитального тракта, менингиты [5, 6, 10, 12, 28, 34, 35]. На основании филогенетического анализа корового генома (core genome) Bialek-Davenet S. и соавт. [5] выявили наличие у штаммов клебсиелл двух эволюционных линий, к одной из которых принадлежат штаммы классических *K. pneumoniae* (*cK. pneumoniae*) с МЛУ и низкой вирулентностью, являющиеся нозокомиальными возбудителями. Вторая линия объединила штаммы клебсиелл, обладающие высоковирулентными или гипервирулентными свойствами (*hvK. pneumoniae*) с низким уровнем антибиотикорезистентности и обуславливающие развитие внебольничных инфекций, в том числе у здоровых людей [2, 9, 15, 24, 28, 35, 38, 45]. Высокий уровень вирулентности *hvK. pneumoniae* обеспечивается наличием дополнительных факторов патогенности, к которым относятся белки-сидерофоры (сальмохелин, аэробактин, энтеробактин) [33, 34, 35, 38], ABC-система утилизации железа (*kfuABC*), регуляторы формирования гипермукоидного фенотипа (*rmpA/A2*), гены капсулообразования (*magA*, *k2A*, *wcaG*) [35, 38, 45] и синтеза липополисахаридов (*wabG*, *uge*, *ycfM*) [20, 33, 35, 45], аллантаин-утилизирующая система (*allA*, *gcl*, *allD*, *allR*, *allS*) [12, 33, 34, 38]. Наличие таких генов способствует проявлению штаммами *hvK. pneumoniae* высоко инвазивных свойств и быстрому размножению в тканях человека, поскольку продукция нескольких типов сидерофоров обеспечивает доступ к ионам железа, капсулообразование способствует ускользанию от иммунной защиты организма человека, а система утилизации аллантаина служит источником азота. Дополнительные факторы патогенности имеют хромосомную локализацию, а также находятся в структуре мобильных элементов, таких как плазмиды вирулентности рK2044-подобные и рLVPK-подобные (номера депонирования GenBank CP026012.1 и AY378100.1 соответственно) [10, 45], конъюгативный интегративный элемент ICEKp, встраивающийся в хромосому в сайтах аспарагиновой тРНК [27], остров патогенности KPNP1208 [23]. Все эти мобильные структуры имеют схожие участки, кодирующие йерсиниобактин и сальмохелин. Остров патогенности KPNP1208 несет дополнительные модули: кластер генов колибактина (*clb*) и микроцина [23].

Штаммы *hvK. pneumoniae* начали регистрироваться с середины 80-х гг. прошлого века исключительно на территории Азиатско-Тихоокеанского региона, но в связи с усилением миграционного потока и туристической актив-

ности с начала 2000-х гг. высоковирулентные штаммы стали также обнаруживаться на территории Европы, Африки, Америки и России. Особую тревогу вызывают сообщения о случаях приобретения такими штаммами детерминант множественной лекарственной устойчивости [11, 16, 40, 46], что свидетельствует о формировании суперпатогена двойного риска. Однако следует отметить, что имеется существенный дефицит информации о детальной молекулярно-генетической характеристике представителей эволюционной ветки, включающей *hvK. pneumoniae*, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью.

Материалы и методы

Объектом исследования был клинический изолят *K. pneumoniae* KP254, выделенный из раневого отделяемого пациента ожогового отделения клиники Приволжского исследовательского медицинского университета, характеризующийся множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), в том числе к карбапенемам. Антибиотикограмма для данного штамма представлена в нашей статье, опубликованной ранее [1]. Для выделения ДНК использовали набор «АмплиПрайм ДНКсорб-В» (ЦНИИЭ, Москва). Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Австрия). При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent kit v2 (500 циклов). Выравнивание и сборку нуклеотидных последовательностей *de novo* осуществляли с помощью программы SPAdes (версия 3.9.1). Аннотирование проводили с использованием Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok) и сервера Rapid Annotation using Subsystem Technology (<https://rast.nmpdr.org>). С помощью сервиса BLASTN осуществляли поиск гомологичных последовательностей, принадлежащих мобильным элементам, в первую очередь — плазмидам, и подбор наиболее близких референс-последовательностей целых плазмид, депонированных в базе данных GenBank. Типирование по группам несовместимости плазмид *in silico* проводили с использованием web-сервиса PlasmidFinder [8], а также базы данных plasmid MLST database (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_plasmid_seqdef). Детекцию детерминант антибиотикорезистентности и патогенности осуществляли с помощью базы данных Klebsiella Sequence Typing (<http://bigdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) и сервера Center for Genomic Epidemiology

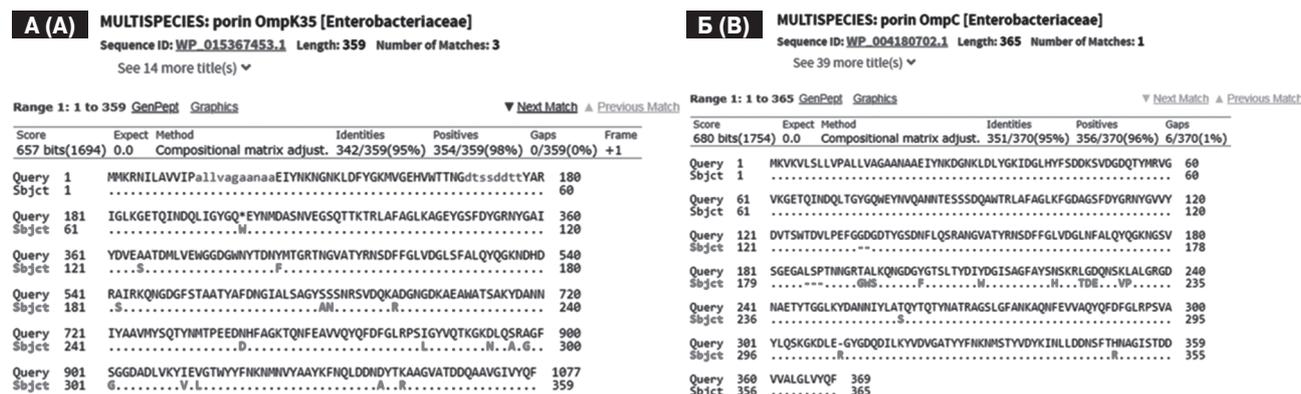


Рисунок 1. Сравнительный анализ транслированных последовательностей генов *ompK35* (A) и *ompK36* (B) штамма *K. pneumoniae* KP254 и референсных аминокислотных последовательностей белков OmpK35 и OmpK36 (OmpC)

Figure 1. Comparative analysis of the *ompK35* (A) and *ompK36* (B) gene translated sequences from *K. pneumoniae* KP254 strain and the OmpK35 and OmpK36 (OmpC) reference amino acid sequences

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services>). Web-сервисы ISfinder [36] и INTEGRALL [29] использовали для поиска и характеристики мобильных элементов, связанных с детерминантами антибиотикорезистентности.

Филогенетический анализ проводили с помощью web-сервиса REALPHY [3], построение дендрограмм осуществляли в программе MEGA (версия 7.0.21), используя алгоритм ближайшего соседа (Neighbor-Joining) с бутстреп-поддержкой (1000 повторов).

Результаты

В результате сборки коротких чтений получено 103 контига (номера депонирования GenBank MRYL02000001–MRYL02000103). Характеристика общей структуры генома *K. pneumoniae* KP254 дана в ранее опубликованном материале [1]. Согласно результатам типирования, штамм *K. pneumoniae* KP254 относится к сиквенс-типу 23 и капсульному типу 57. В соответствии с полученными данными, штамм KP254 был отнесен к клональной группе (CG) 23, принадлежащей эволюционной ветке *hvK. pneumoniae*. Согласно результатам аннотирования, в структуре хромосомы исследуемого штамма из детерминант патогенности выявлены гены, кодирующие фимбриии 1-го и 3-го типов и йерсиниобактин. Гены системы утилизации аллантаина, сальмохелина, интегративного и конъюгативного элемента ICEKp, островка патогенности KPNP1208 выявлены не были. В хромосомной нуклеотидной последовательности обнаружены гены *bla*_{SHV-1} и *fosA*, кодирующие устойчивость к β-лактамам и фосфомицину соответственно, а также детерминанты эффлюксных помп *OqxAB*, *AcrAB-TolC*, *AcrZ*, *CusA/CzcA* (семейство Resistance-Nodulation-Division — RND) [25,

66, 35, 44], *MdtM*, *Vcr/CflA* (семейство Major Facilitator Superfamily — MFS) [18, 30], *QacE*, *KpnEF* (семейство Small Multidrug Resistance — SMR) [22, 37], *MacAB-TolC* (семейство ATP-Binding Cassette — ABC) [26]. Изучение транслированных последовательностей генов мажорных пориновых белков OmpK35 и OmpK36 позволило выявить наличие стоп-кодона в последовательности белка OmpK35 и замен, вставок и делеций в структуре OmpK36 относительно референсных последовательностей WP_004141771.1 и WP_004180702.1 [41] (рис. 1A и 1B соответственно).

Филогенетический анализ генома показал наибольшее родство *K. pneumoniae* KP254 со штаммом *Kp-Goe-154414* (номер GenBank CP018337.1), выделенным из инфицированной раны мужчины в Германии в 2014 году и принадлежащим также сиквенс-типу 23 и капсульному типу K57 (рис. 2).

По данным типирования *in silico*, в структуре мобилома штамма *K. pneumoniae* KP254 обнаружены репликоны плазмид *IncFII*, *IncFIA_{III}/FII_K*, *Col₄₄₀₁*, *Col_{pvc}*, *IncFIB_K* и *IncFII_{pCRY}*. С использованием сервиса BLASTN отобраны контиги, потенциально принадлежащие мобильным элементам, которые в дальнейшем были объединены в предполагаемые плазмиды относительно референсных последовательностей. В таблице приведены результаты анализа структуры мобилома штамма KP254 *in silico*, который представлен, предположительно, шестью плазмидами, из которых одна является плазмидой вирулентности (*IncFIB_K*) и две — плазмидами резистентности (*IncFII_{pCRY}*, *IncFII*).

Плазмида вирулентности *IncFIB_K* имеет длину около 188 тыс. п.н., покрытие ее нуклеотидной последовательности относительно последовательностей плазмид pK2044 и pLVPK

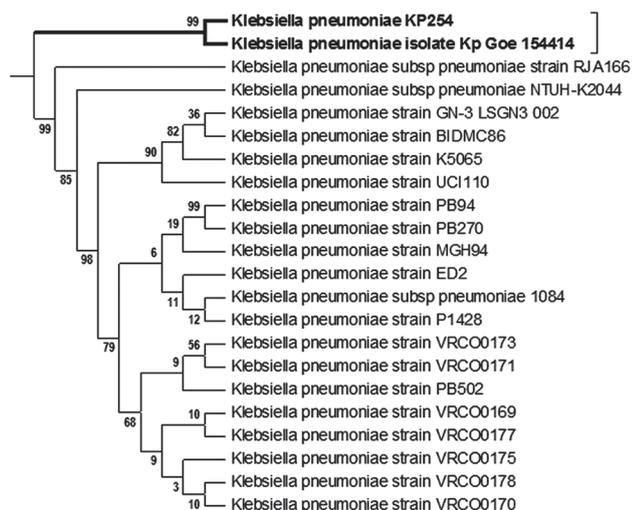


Рисунок 2. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности хромосомы штамма *K. pneumoniae* KP254 (выделен жирным)

Figure 2. Phylogenetic analysis of the strain *K. pneumoniae* KP254 chromosome nucleotide sequence (highlighted in bold)

составляет 93 и 91% соответственно, с уровнем идентичности более 99%. При аннотировании последовательностей контигов обнаружен кластер генов аэробактина (*iucABCD iutA*) и гены устойчивости к ионам тяжелых металлов (*pbrABCR, pcoBCDERS, silCE, terDX*). Также в структуре одного контига (номер GenBank MRYL02000014.1) выявлен ген регулятора муконидного фенотипа клебсиелл *rmpA2*, алельный вариант 17 (согласно базе данных *Klebsiella Sequence Typing*). При этом у плазмиды исследуемого штамма дилетированными оказались области, содержащие гены регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA* и сальмохелина.

Филогенетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность плазмиды IncFIB_K исследуемого штамма является наиболее близкородственной плазмиде pL22-1 (CP031258.1) гипервирулентного штамма *K. quasipneumoniae* L22, выделенного от больного пневмонией в 2014 г. в Китае (рис. 3).

В структуре мобилома штамма *K. pneumoniae* KP254 выявлен контиг, содержащий реплика-

Таблица. Характеристика мобилома штамма *K. pneumoniae* KP254

Table. Characterization of the strain *K. pneumoniae* KP254 mobilome

Репликоны плазмид (% идентичности относительно референса) Plasmid replicons (% identity relative to reference)	Номера референс-геномов плазмид в GenBank GenBank accession number of reference plasmid genome	Номера контигов в GenBank GenBank accession number of contigs	Гены антибиотико-резистентности Antibiotic resistance determinants	Гены патогенности Pathogenicity determinants
IncFII (100)	CP018343.1	MRYL02000035.1, MRYL02000046.1, MRYL02000053.1, MRYL02000055.1, MRYL02000058.1, MRYL02000061.1, MRYL02000072.1, MRYL02000075.1, MRYL02000076.1, MRYL02000090.1, MRYL02000096.1	<i>bla</i> _{OXA-11} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>ΔcatB4</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Не выявлено Not found
IncFIA _{III} (97,16)/ FIK (98,65)	CP018340.1	MRYL02000026.1, MRYL02000045.1, MRYL02000056.1, MRYL02000082.1	Не выявлено Not found	Не выявлено Not found
IncFII _{pCRY} (81,32)	CP018341.1	MRYL02000023.1, MRYL02000047.1, MRYL02000066.1	<i>bla</i> _{LAP-2} , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul2</i> , <i>catA2</i>	Не выявлено Not found
IncFIB _K (91,25)	CP018338.1	MRYL02000014.1, MRYL02000036.1, MRYL02000038.1, MRYL02000048.1, MRYL02000052.1, MRYL02000054.1, MRYL02000068.1, MRYL02000071.1, MRYL02000088.1, MRYL02000089.1	Не выявлено Not found	<i>rmpA2</i> , <i>iucABCD</i> , <i>iutA</i> , <i>pbrABCR</i> , <i>pcoBCDERS</i> , <i>silCE</i> , <i>terDX</i>
Col ₄₄₀₁ (92,11)	CP003995.1	MRYL02000051.1	Не выявлено Not found	Не выявлено Not found
Col _{pVC} (88,95)	-	MRYL02000063.1	Не выявлено Not found	Не выявлено Not found

ны IncFIA_{HTI}/FIIK. Согласно результатам отбора контигов относительно референса (номер GenBank CP018340.1), длина предполагаемой плазмиды составила около 80 тыс. п.н. В структуре контигов определены гены, ответственные за конъюгативный транспорт. Известных детерминант резистентности и патогенности выявлено не было.

Мобилом штамма *KP254* представлен, вероятно, двумя плазмидами резистентности: IncFII и IncFII_{PCRY}-подобной. В предполагаемой плазмиде размером 59 160 п.н., содержащей репликон IncFII, находится ген CTX-M-55-цефалоспорины (контиг MRYL02000053.1). Согласно схеме типирования, предложенной Villa L. и соавт. [42], FАВ-формула данной плазмиды — F2:A:B-. В генетическое окружение гена *bla*_{CTX-M-55} входит укороченная последовательность транспозона Tn3 длиной 2246 п.н., ген металлопротеина семейства WbuC, перед геном *bla*_{CTX-M-55} на расстоянии 48 п.н. расположен остаток инсерционного элемента Δ ISEcp1 (длина 267 п.н.), вся структура фланкирована укороченными инсерционными последовательностями Δ IS26. Предположительно, в структуру плазмиды IncFII входят также сцепленные гены Δ catB4, *bla*_{OXA-1}, *aac(6)-Ib-cr* (контиг MRYL02000061.1), окруженные остатками генов транспозаз семейства IS6, и ген *aac(3)-IIa* (контиг MRYL02000058.1), связанный с неполными последовательностями транспозаз семейств IS3 и IS6. В структуре контигов, объединенных в предполагаемую плазмиду, присутствуют гены, ответственные за конъюгативный перенос. Согласно базе данных GenBank, ген *bla*_{CTX-M-55} присутствует у 641 депонированного штамма энтеробактерий, однако полногеномные последовательности плазмид IncFII генотипа F2:A:B-, содержащих данный ген, представлены очень ограниченным числом, большинство последовательностей находится в виде коротких контигов. В связи с этим, на данный момент проведение филогенетического анализа оказалось невозможным.

Вторая предполагаемая плазмиды резистентности длиной около 80 тыс. п.н. несет IncFII_{PCRY}-подобный репликон. В ее структуре обнаружена детерминанта β -лактамазы LAP-2 (контиг MRYL02000023.1), на одной последовательности с геном *bla*_{LAP-2} расположены гены детерминант, ответственных за устойчивость к хинолонам (*qnrS1*) и тетрациклину (*tetA*). Анализ генетического окружения *bla*_{LAP-2} показал, что перед генами *qnrS1* и *bla*_{LAP-2} находится инсерционная последовательность ISKpn19, расстояние между генами составляет 1597 п.н., и здесь располагается инсерционная последовательность Δ ISEcl2 семейства IS3 длиной 1154 п.н. (является псевдогеном за счет наличия стоп-кодона),

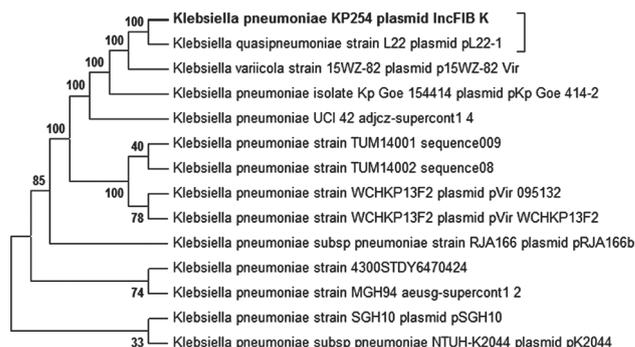


Рисунок 3. Дендрограмма нуклеотидной последовательности плазмиды вирулентности IncFIB_K штамма *K. pneumoniae* KP254 (выделено жирным) относительно последовательностей плазмид вирулентности, депонированных в GenBank

Figure 3. Dendrogram of the IncFIB_K virulence plasmid nucleotide sequence of *K. pneumoniae* KP254 strain (highlighted in bold) relative to the virulence plasmid sequences deposited in GenBank

а после — неполная последовательность транспозазы семейства TnAs1. В структуру данной плазмиды были объединены также контиги, несущие гены устойчивости к хлорамфениколу (*catA2*) и сульфаниламидам (*sul2*), которые также окружены мобильными элементами. В частности, ген *sul2* расположен между инсерционными элементами ISVsa3 (семейство IS91) и IS5075 (семейство IS110) (контиг MRYL02000047.1), а концы короткого контига, содержащего ген *catA2*, представляют собой остатки транспозаз семейства IS6 (контиг MRYL02000066.1). В структуре плазмиды также присутствуют контиги, содержащие гены конъюгативного транспорта. Поиск гомологичных последовательностей с помощью сервиса BLASTN позволил установить ши-

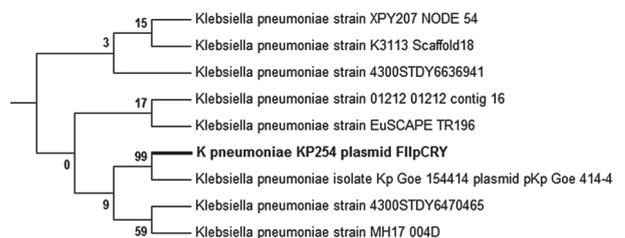


Рисунок 4. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности плазмиды IncFII_{PCRY} штамма *K. pneumoniae* KP254 (выделено жирным) относительно последовательностей плазмид, депонированных в GenBank

Figure 4. Dendrogram of the IncFII_{PCRY} plasmid nucleotide sequence of *K. pneumoniae* KP254 strain (highlighted in bold) relative to the sequences of plasmids deposited in GenBank

рокое распространение IncFII_{PCRY}-подобных плазмид, несущих ген *bla*_{LAP}, среди штаммов клебсиелл. Филогенетический анализ выявил высокий уровень родства последовательностей предполагаемой IncFII_{PCRY}-подобной плазмиды исследуемого штамма с последовательностями плазмиды *pKp-Goe-414-4* (номер GenBank CP018337.1) (рис. 4).

Репликон *Col*₄₄₀₁ выявлен в структуре контига MRYL02000051.1, в котором, согласно результатам аннотирования, имеется ряд гипотетических белков, детерминанты патогенности или резистентности не обнаружены. В результате поиска относительно базы данных RefSeq высокоомологичные последовательности (идентичность выше 94%) выявлены у более 100 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в различных регионах мира.

Контиг MRYL02000063.1, содержащий *Col*_{psc}-подобный репликон, имеет уровень идентичности более 99% с полногеномными последовательностями коротких плазмид, обнаруженных в штаммах *Escherichia coli* и *K. pneumoniae*, а также с последовательностями штаммов клебсиелл, депонированных в виде контигов.

Обсуждение

Полученная молекулярно-генетическая характеристика исследуемого штамма показывает, что исследуемый штамм хотя и относится к эволюционной ветке высоковирулентных *K. pneumoniae*, однако не обладает полным набором соответствующих детерминант. Наличие генов, кодирующих фимбрии и йерсениобактин, является общим для обеих эволюционных линий *K. pneumoniae* [34, 35, 38], а отсутствие дополнительных факторов патогенности (сальмохелина, системы утилизации аллантаина, гена *rpmA* и др.) может, на первый взгляд, свидетельствовать о невысоком патогенетическом потенциале исследуемого штамма. Этот вывод согласуется, например, с данными исследований, проведенных Lev A.I. и соавт. [24] на мышинных моделях, в которых было показано, что 2 штамма клебсиелл ST23^{K57} являлись авирулентными. Однако результаты других исследований свидетельствуют о том, что потеря сальмохелина и гена регулятора мукоидного фенотипа *rpmA* не приводит к значительному снижению вирулентности [16], а исследования Russo T.A. и соавт. [33] выявили наибольшую значимость продукции аэробактина для проявления вирулентных свойств. На основании всех этих данных был сделан вывод, что наличие только генов аэробактина и белка *RpmA2* является достаточным для формирования гипервирулентного фенотипа [33, 35]. Можно также сделать предположение, что отсутствие дополнительных фак-

торов связано с местом выделения штамма. Так, по данным литературы, наличие ICEKp было выявлено у всех штаммов, ассоциированных с первичным гнойным абсцессом печени [27]. Штаммы, колонизирующие кишечный тракт и слизистую оболочку, обладали генами утилизации аллантаина (кластер генов *all*), продукции капсульного полисахарида (*kvgAS*) и системы поглощения железа (*kfuABC*) [20, 28, 35]; для штаммов, ассоциированных с пневмонией, важным фактором является наличие гена *peg-344* [6, 35]. Интересным представляется результат филогенетического анализа, в котором последовательность генома исследуемого штамма кластеризуется с последовательностью штамма *K. pneumoniae*, также выделенного с поверхности инфицированной раны и обладающего тем же набором хромосомных детерминант патогенности и антибиотикорезистентности.

Наличие МЛУ у штаммов клебсиелл, относящихся к эволюционной линии *hvK. pneumoniae*, теперь уже не вызывает удивления. Первые сообщения об обнаружении таких штаммов в Китае датируются 2014 годом, затем аналогичные штаммы стали регистрироваться в различных странах мира. Изучение структуры резистома показало, что антибиотикоустойчивость исследуемого штамма реализуется, в первую очередь, за счет приобретения генетических детерминант, находящихся предположительно на двух конъюгативных плаزمиде IncFII и IncFII_{PCRY}. В структуре предполагаемой плазмиды IncFII выявлены четыре детерминанты резистентности — по две к аминогликозидам/фторхинолонам и бета-лактамам (OXA-1, CTX-M-55) (табл.). Известно, что плазмиды IncFII в наибольшей степени участвуют в распространении генов *bla*_{CTX-M} [42, 47]: в частности, плазмиды генотипа F2:A-B- являются одними из основных носителей генов CTX-M-9 и CTX-M-15 цефалоспоринов [9, 13]. Что касается детерминанты CTX-M-55-цефалоспориноназы, то, согласно литературным данным, она чаще регистрируется в структуре плазмид IncFII генотипа F33:A-B-[13], IncI, IncN, IncX [31, 43]. Детерминанта бета-лактамазы расширенного спектра CTX-M-55-цефалоспориноназы в настоящее время не является эпидемически распространенной на территории РФ [14], однако на территории Китая находится в лидерах по распространенности [19]. Впервые ген был выявлен на территории Таиланда в 2005 г., аминокислотная последовательность CTX-M-55 имеет единственную замену Ala-80-Val относительно эпидемически распространенной CTX-M-15, которая обуславливает повышенную устойчивость к цефтазидиму [21]. Структурная организация генетического окружения гена *bla*_{CTX-M-55} штамма *K. pneumoniae* KP254 является наибо-

лее распространенной и относится к типу I, согласно классификации Ну Х. и соавт. [19]. Одновременное присутствие в структуре одной плазмиды генов *bla*_{ОХА-1}, *bla*_{СТХ-М}, *aac*(3')-IIa, *ΔcatB4*, *aac*(6')-Ib-cr широко распространено среди представителей энтеробактерий.

Интересным представляется наличие в структуре предполагаемой IncFII_{PCRY}-подобной плазмиды детерминанты бета-лактамазы LAP-2, относящейся к классу А бета-лактамаз и являющейся аналогом TEM-1 [32] — ранее об обнаружении данной детерминанты среди российских изолятов клебсиелл не сообщалось. В соответствии с данными на апрель 2020 г. в GenBank депонировано всего 634 штамма бактерий, несущих ген *bla*_{LAP-2}. Первые описания генетического окружения были сделаны для аллельного варианта *bla*_{LAP-1}, выявленного в штамме *Enterobacter cloacae* [32]. При сравнительном анализе структуры генетического окружения гена *bla*_{LAP-2} штамма *K. pneumoniae* KP254 выявлено значительное его сходство с описанным ранее Poigel L и соавт. [32] для штамма *E. cloacae*, где ген также ассоциирован с детерминантой белка *QrnS1*, находящейся на расстоянии в 1597 п.н. В исследовании Poigel L и соавт. показано, что между генами находится последовательность *ISEc12* длиной 1282 п.н. В случае с *K. pneumoniae* KP254 эта последовательность короче и имеет большое количество мутаций, которые привели к формированию стоп-кодонов. Отметим, что участок нуклеотидной последовательности всей мобильной единицы, включающей *bla*_{LAP-2} и *QrnS1*, штамма KP254 имеет 100%-ное сходство с соответствующими участками, присутствующими в 12 полногеномных последовательностях плазмид штаммов *K. pneumoniae* и одной — *Salmonella enterica*, а также 81 последовательности *K. pneumoniae*, депонированных в виде контигов. Филогенетический анализ, который включал исследование полногеномных последовательностей плазмид IncFII_{PCRY} и последовательностей контигов, показал, что предполагаемая IncFII_{PCRY}-подобная плаزمида штамма *K. pneumoniae* KP254 имеет наибольшее родство с последовательностью плазмиды *pKp-Goe-414-4*.

Установлено, что исследуемый штамм обладает устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам, включая карбапенемы (Дорипенем, Имипенем, Меропенем, Эртапенем) [1], однако в структуре резистома гены карбапенемаз отсутствуют. Известно, что проявление устойчивости к карбапенемам коррелирует с функционированием мажорных пориновых белков OmpK35 и OmpK36 [39, 41], в частности, по данным Tsai Y.-K. и соавт. [41], наличие мутаций в последовательностях обоих белков в несколько раз увеличивает значения минимальных

ингибирующих концентраций меропенема и цефепима. У штамма *K. pneumoniae* KP254 выявлено наличие стоп-кодона в последовательности гена *ompK35*, что приводит к отсутствию его экспрессии, аминокислотная структура OmpK36 также имеет значительные отличия от референсной. Таким образом, можно сделать предположение, что измененная структура обоих пориновых белков является одним из факторов, обуславливающих устойчивость к карбапенемам.

Другим механизмом, участвующим в проявлении МЛУ, является активация эффлюксных транспортных систем в ответ на воздействие лекарственного вещества [26]. В структуре генома *K. pneumoniae* KP254 обнаружено несколько типов транспортных систем, активность которых может оказывать синергетический эффект, формируя устойчивость в том числе и к карбапенемам. Наибольшую значимость имеют белки семейства RND — AcrA и AcrB, — которые формируют трехкомпонентный комплекс AcrAB-TolC, обладающий широкой субстратной специфичностью [26, 44]. В структуре генома был выявлен ген, кодирующий короткий белок AcrZ, который образует комплекс с AcrAB-TolC через AcrB, способствуя распознаванию и экспорту дополнительных субстратов, в частности тетрациклина, пурамицина и хлорамфеникола [17]. Геном штамма содержит и другие помпы семейства RND: OqxAB (транспорт хинолонов, фторхинолонов и хлорамфеникола) [25], CusA/CzcA (эффлюкс ионов кобальта, цинка, кадмия) [7]. Согласно литературным данным, в удалении карбапенемов может участвовать система KpnEF семейства SMR, осуществляющая транспорт широкого спектра антибактериальных препаратов и участвующая в капсулообразовании [37]. К семейству SMR относится также белок QacE, обеспечивающий выведение четвертичных аммонийных соединений [22]. Представители семейства MFS не являются доминирующими в формировании МЛУ, наибольшее клиническое значение имеет синглетная транспортная система TetA, определяющая устойчивость к тетрациклинам [26]. К другим представителями этого семейства, присутствующим в структуре генома *K. pneumoniae* KP254, относится транспортный белок MdtM, участвующий в выведении четвертичных аммонийных соединений [18], система Vcr/CflA, функция которой у клебсиелл не определена, но на примере *Proteus mirabilis* показано, что она ответственна за устойчивость к фосфомицину и необходима для формирования биопленки [30]. Семейство ABC-транспортёров у штамма *K. pneumoniae* KP254 представлено только генами белков MacAB, которые при образовании комплекса MacAB-TolC обеспечивают эффлюкс макролидов [26].

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать заключение, что у штаммов, относящихся к эволюционной линии, включающей *hvK. pneumoniae*, при приобретении фенотипа МЛУ могут отсутствовать гены, определяющие формирование дополнительных вирулентных свойств. Аналогичный вывод был сделан Russo T.A. и соавт. [33]. Однако, с другой стороны, отсутствие некоторых факторов патогенности может быть связано с местом локализации исследуемого штамма. Формирование МЛУ штаммом *K. pneumoniae* KP254 определяется в первую очередь приобретением соответ-

ствующих детерминант резистентности, находящихся на конъюгативных плазидах. В то же время устойчивость к карбапенемам, при отсутствии генов карбапенемаз, связана с наличием альтернативных механизмов, в частности с изменением структуры пориновых белков и функционированием систем эффлюксных насосов, обладающих широкой субстратной специфичностью. Полученные нами сведения в целом способствуют расширению знаний о штаммах *K. pneumoniae*, относящихся к эволюционной ветке, объединяющей штаммы с высоковирулентными свойствами.

Список литературы/References

1. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Солнцев Л.А., Гординская Н.А. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 11. С. 699–704. [Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Solntsev L.A., Gordinskaya N.A. The molecular typing of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* producing beta-lactamases of extended specter of action. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, vol. 62, no. 11, pp. 699–704. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704
2. Комисарова Е.В., Воложанцев Н.В. Гипервирулентная *Klebsiella pneumoniae* — новая инфекционная угроза // Инфекционные болезни. 2019. Т. 17, № 3. С. 81–89. [Komisarova E.V., Volozhantsev N.V. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2017, vol. 17, no. 3, pp. 81–89. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89
3. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.*, 2014, vol. 31, no. 5, pp. 1077–1088. doi: 10.1093/molbev/msu088
4. Bhagirath A.Y., Li Y., Patidar R., Yerex K., Ma X., Kumar A., Duan K. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in gram-negative pathogens. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 7: 1781. doi: 10.3390/ijms20071781
5. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., Passet V., Jones L., Delannoy-Vieillard A., Garin B., Le Hello S., Arlet G., Nicolas-Chanoine M.-H., Decré D., Brisse S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1812–1820. doi: 10.3201/eid2011.140206
6. Bulger J., MacDonald U., Olson R., Beanan J., Russo T.A. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hvKP1 after pulmonary but not subcutaneous challenge. *Infect. Immun.*, 2017, vol. 85, no. 10: e00093-17. doi: 10.1128/IAI.00093-17
7. Cabral L., Júnior G.V.L., Pereira de Sousa S.T., Dias A.C.F., Lira Cadete L., Andreote F.D., Hess M., de Oliveira V.M. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. *Environ. Pollut.*, 2016, vol. 216, pp. 460–469. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.078
8. Carattoli A., Hasman H. PlasmidFinder and in silico pMLST: identification and typing of plasmid replicons in whole-genome sequencing (WGS). *Methods Mol. Biol.*, 2020, vol. 2075, pp. 285–294. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_20
9. Chen X., He L., Li Y., Zeng Z., Deng Y., Liu Y., Liu J.-H. Complete sequence of a F2:A-B- plasmid pHN3A11 carrying *rmtB* and *qepA*, and its dissemination in China. *Vet. Microbiol.*, 2014, vol. 174, no. 1–2, pp. 267–271. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.08.023
10. Chen Y.T., Chang H.Y., Lai Y.C., Pan C.C., Tsai S.F., Peng H.L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae*. *Gene*, 2004, vol. 337, pp. 189–198. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.008
11. Cheong H.S., Chung D.R., Park M., Kim S.H., Ko K.S., Ha Y.E., Kang C.I., Peck K.R., Song J.H. Emergence of an extended-spectrum β -lactamase-producing serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strain from Asian countries. *Epidemiol. Infect.*, 2017, vol. 145, no. 5, pp. 990–994. doi: 10.1017/S0950268816003113
12. Chou H.C., Lee C.Z., Ma L.C., Fang C.T., Chang S.C., Wang J.T. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 7, pp. 3783–3792. doi: 10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004
13. Deng Y., He L., Chen S., Zheng H., Zeng Z., Liu Y., Sun Y., Ma J., Chen Z., Liu J.H. F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of *rmtB*-*bla*CTX-M-9 group genes and *rmtB*-*qepA* in Enterobacteriaceae isolates from pets in China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 10, pp. 4926–4929. doi: 10.1128/AAC.00133-11
14. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, no. 12, pp. 3724–3732. doi: 10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003
15. Fang C.T., Chuang Y.P., Shun C.T., Chang S.C., Wang J.T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 199, no. 5, pp. 697–705. doi: 10.1084/jem.20030857
16. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., Chan E.W., Shu L., Yu J., Zhang R., Chen S. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, vol. 18, no. 1, pp. 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9
17. Hobbs E.C., Yin X., Paul B.J., Astarita J.L., Storz G. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 41, pp. 16696–16701. doi: 10.1073/pnas.1210093109

18. Holdsworth S.R., Law C.J. The major facilitator superfamily transporter MdtM contributes to the intrinsic resistance of *Escherichia coli* to quaternary ammonium compounds. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013, vol. 68, no. 4, pp. 831–839. doi: 10.1093/jac/dks491
19. Hu X., Gou J., Guo X., Cao Z., Li Y., Jiao H., He X., Ren Y., Tian F. Genetic contexts related to the diffusion of plasmid-mediated CTX-M-55 extended-spectrum beta-lactamase isolated from Enterobacteriaceae in China. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2018, vol. 17, no. 1. doi: 10.1186/s12941-018-0265-x
20. Izquierdo L., Coderch N., Piqué N., Bedini E., Corsaro M.M., Merino S., Fresno S., Tomás J.M., Regué M. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 24, pp. 7213–7221. doi: 10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003
21. Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Saifon P., Laesripa C., Kitphati R., Mundy L.M. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, vol. 58, no. 3, pp. 349–355. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.005
22. Kücken D., Feucht H., Kaulfers P. Association of qacE and qacEDelta1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, vol. 183, iss. 1, pp. 95–98. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08939.x
23. Lai Y.C., Lin A.C., Chiang M.K., Dai Y.H., Hsu C.C., Lu M.C., Liu C.Y., Chen Y.T. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 5: e96292. doi: 10.1371/journal.pone.0096292
24. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Malikov V.E., Bogun A.G., Borzilov A.I., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Fursova N.K. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health*, 2018, vol. 112, no. 3, pp. 142–151. doi: 10.1080/20477724.2018.1460949
25. Li J., Zhang H., Ning J., Sajid A., Cheng G., Yuan Z., Hao H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 2019, vol. 8, no. 44. doi: 10.1186/s13756-019-0489-3
26. Li X.-Z., Plésiat P., Nikaido H. The challenge of efflux mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 2, pp. 337–418. doi: 10.1128/CMR.00117-14
27. Lin T.L., Lee C.Z., Hsieh P.F., Tsai S.F., Wang J.T. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 2, pp. 515–526. doi: 10.1128/JB.01219-07
28. Ma L.-C., Fang C.-T., Lee C.-Z., Shun C.-T., Wang J.-T., Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 192, no. 1, pp. 117–128. doi: 10.1086/430619
29. Moura A., Soares M., Pereira C., Leitão N., Henriques I., Correia A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 8, pp. 1096–1098. doi: 10.1093/bioinformatics/btp105
30. Nzakizwanayo J., Scavone P., Jamshidi S., Hawthorne J.A., Pelling H., Dedi C., Salvage J.P., Hind C.K., Guppy F.M., Barnes L.M., Patel B.A., Rahman K.M., Sutton M.J., Jones B.V. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystal-line biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 12222. doi: 10.1038/s41598-017-12445-w
31. Pan Y.S., Liu J.H., Hu H., Zhao J.F., Yuan L., Wu H., Wang L.F., Hu G.Z. Novel arrangement of the blaCTX-M-55 gene in an *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA methylase. *J. Basic. Microbiol.*, 2013, vol. 53, no. 11, pp. 928–933. doi: 10.1002/jobm.201200318
32. Poirel L., Cattoir V., Soares A., Soussy C.J., Nordmann P. Novel Ambler class A beta-lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, no. 2, pp. 631–637. doi: 10.1128/AAC.01082-06
33. Russo T.A., Olson R., Fang C.-T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U., Hutson A., Barker J.H., La Hoz R.M., Johnson J.R. for the Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Investigator Group (HVKPIG). Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 56 (9): e00776-18. doi: 10.1128/JCM.00776-18
34. Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J., Gulick A.M. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hyper-mucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 6, pp. 2356–2367. doi: 10.1128/IAI.01667-13
35. Russo T.A., Marr C.M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, vol. 32 (3): e00001-19. doi: 10.1128/CMR.00001-19
36. Siguier P., Perochon J., Lestrade L., Mahillon J., Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 34, pp. D32–D36. doi: 10.1093/nar/gkj014
37. Srinivasan V.B., Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 9, pp. 4449–4462. doi: 10.1128/AAC.02284-12
38. Struve C., Roe C.C., Stegger M., Stahlhut S.G., Hansen D.S., Engelthaler D.M., Andersen P.S., Driebe E.M., Keim P., Krogfelt K.A. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*, 2015, vol. 6 (4): e00630-15. doi: 10.1128/mBio.00630-15
39. Sugawara E., Kojima S., Nikaido H. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. *J. Bacteriol.*, 2016, vol. 198, no. 23, pp. 3200–3208. doi: 10.1128/JB.00590-16
40. Surgers L., Boyd A., Girard P.M., Arlet G., Decré D. ESBL-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 1687–1688. doi: 10.3201/eid2209.160681
41. Tsai Y.-K., Fung C.-P., Lin J.-C., Chen J.-H., Chang F.-Y., Chen T.-L., Siu L.K. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 4, pp. 1485–1493. doi: 10.1128/AAC.01275-10

42. Villa L., García-Fernández A., Fortini D., Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, vol. 65, no. 12, pp. 2518–2529. doi: 10.1093/jac/dkq347
43. Wang L., Fang H., Feng J., Yin Z., Xie X., Zhu X., Wang J., Chen W., Yang R., Du H., Zhou D. Complete sequences of KPC-2-encoding plasmid p628-KPC and CTX-M-55-encoding p628-CTXM coexisted in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 838. doi: 10.3389/fmicb.2015.00838
44. Weston N., Sharma P., Ricci V., Piddock L.J.V. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Res. Microbiol.*, 2018, vol. 169, no. 7–8, pp. 425–431. doi: 10.1016/j.resmic.2017.10.005
45. Wu K.M., Li L.H., Yan J.J., Tsao N., Liao T.L., Tsai H.C., Fung C.P., Chen H.J., Liu Y.M., Wang J.T., Fang C.T., Chang S.C., Shu H.Y., Liu T.T., Chen Y.T., Shiao Y.R., Lauderdale T.L., Su I.J., Kirby R., Tsai S.F. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 14, pp. 4492–4501. doi: 10.1128/JB.00315-09
46. Yuan Y., Li Y., Wang G., Li C., Chang Y.F., Chen W., Nian S., Mao Y., Zhang J., Zhong F., Zhang L. BlaNDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2019, vol. 8: 140. doi: 10.1186/s13756-019-0596-1
47. Zhao W.H., Hu Z.Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 39, no. 1, pp. 79–101. doi: 10.3109/1040841X.2012.691460

Авторы:

Алексеева А.Е., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Бруснигина Н.Ф., к.м.н., доцент, зав. лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Гординская Н.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Alekseeva A.E., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina I.N. Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Brusnigina N.F., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina I.N. Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Gordinskaya N.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina I.N. Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.05.2020
Принята к печати 04.07.2020

Received 06.05.2020
Accepted 04.07.2020

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ВЗРОСЛЫХ, БОЛЬНЫХ КОРЬЮ, И ПРИВИТЫХ ОТ ЭТОЙ ИНФЕКЦИИ

А.П. Топтыгина^{1,3}, Ю.Ю. Андреев¹, М.А. Смердова¹, Л.Н. Наврузова², В.В. Малеев²

¹ ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Реализация программы ВОЗ по элиминации кори дала существенные результаты, но в последние годы вновь отмечается рост заболеваемости этой инфекцией. Так, по данным ВОЗ, в 2019 г. случаев заболевания корью в мире было в 3 раза больше, чем в 2018 г. При расследовании вспышек кори среди заболевших, помимо непривитых, выделяется значительная группа привитых в детстве взрослых. Целью настоящей работы было исследование особенностей гуморального противокорьевого иммунитета у взрослых больных корью и привитых от этой инфекции. *Материалы и методы.* Были обследованы 50 больных корью взрослых в возрасте от 20 до 55 лет. Диагноз был подтвержден клинически и лабораторно по наличию противокоревых IgM-антител. Вторую группу составили 50 серонегативных к кори, условно здоровых взрослых, сопоставимых по возрасту, привитых культуральной живой коревой вакциной (Микроген, Россия). Кровь из локтевой вены в количестве 4 мл брали на 6 ± 1 день от появления сыпи у больных и через 6 недель после вакцинации у привитых. Специфические антитела к кори и их avidность определяли методом ИФА с помощью коммерческого набора Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG (Euroimmun, Германия). *Результаты.* Показано, что люди в возрасте 20–35 лет чаще болеют корью, чем более взрослые лица. И именно в этой возрастной группе чаще встречаются серонегативные к кори здоровые индивиды. Среди привитых у 44% был установлен первичный тип иммунного ответа на вакцинацию, а у 56% — вторичный тип, тогда как среди заболевших корью первичный иммунный ответ зафиксирован у 4%, а вторичный — у 66%, что следует из спектра субклассов специфических IgG и их avidности. Вторичный тип иммунного ответа свидетельствует о том, что эти люди, по-видимому, были привиты в детстве от кори, но потеряли с возрастом долгоживущие плазматические клетки, синтезирующие защитные антитела. При сопоставлении параметров специфического гуморального иммунитета в группах с острой коревой инфекцией (6-й день от появления высыпаний) и ранних реконвалесцентом (через 3 недели после появления сыпи) показано, что у ранних реконвалесцентом в три раза возросло количество специфических IgG ($p < 0,01$) по сравнению с лицами с острой инфекцией. Уровень специфических IgA, напротив, снизился с 73,44 (69–75,3) Ме/мл до 48,64 (45–56,4) Ме/мл, оставаясь все еще очень высоким. При этом спектр субклассов специфических IgG изменился с первичного иммунного ответа (высокие IgG3 и низкие IgG1) на вторичный (низкие IgG3 и высокие IgG1), что типично для ответа формирующихся клеток памяти.

Ключевые слова: корь, антитела, субклассы IgG, вакцинация, взрослые, первичный иммунный ответ.

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (495) 452-18-01. Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Contacts:

Anna P. Toptygina
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (495) 452-18-01. Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Для цитирования:

Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Наврузова Л.Н., Малеев В.В. Сопоставление гуморального иммунного ответа у взрослых, больных корью, и привитых от этой инфекции // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 517–522. doi: 10.15789/2220-7619-CHI-1396

Citation:

Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Navruzova L.N., Maleev V.V. Comparing humoral immune response in adult measles patients and measles vaccinated subjects // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 517–522. doi: 10.15789/2220-7619-CHI-1396

COMPARING HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN ADULT MEASLES PATIENTS AND MEASLES VACCINATED SUBJECTS

Топтыгина А.П.^{а,с}, Andreev Yu.Yu.^а, Smerdova M.A.^а, Navruzova L.N.^б, Maleev V.V.^б

^а *Gabrichesky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*

^б *Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation*

^с *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

Abstract. *Introduction.* The implementation of the WHO Measles Elimination Program has yielded serious results, but in recent years an increase in the incidence rate of this infection has been observed. In particular, according to the WHO, in 2019 vs. 2018 measles morbidity was elevated by 3-fold worldwide. While investigating measles outbreaks among patients, apart from unvaccinated subjects, a substantial group of adults vaccinated in childhood was distinguished. The aim of this work was to examine the characteristics of humoral measles immunity in adult measles patients as well as subjects after measles vaccination. *Materials and methods.* 50 adult measles patients aged 20 to 55 years were examined. In all patients, the diagnosis was confirmed clinically and by laboratory assays by detecting measles IgM antibodies. The second group consisted of 50 conditionally healthy seronegative age-matched adults, vaccinated with the live measles vaccine (Microgen, Russia). Peripheral blood samples were collected from the cubital vein in total volume of 4 ml on 6±1 day after the onset of rash in patients as well as 6 weeks after vaccination. Specific measles antibodies and their avidity were determined by ELISA using the commercial Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG kit (Euroimmun, Germany). *Results.* It was shown that people aged 20–35 years more likely suffered from measles than elderly. And it was in this age group that healthy measles seronegative individuals were more abundant. Among vaccinees, 44% responded to vaccination with the primary type of immune response, and 56% responded with the secondary type, while among measles patients, 34% and 66% responded with the primary and secondary type, respectively, as follows from the spectrum of specific IgG subclasses and the antibody avidity assay. The secondary type of immune response indicates that these subjects were apparently vaccinated against measles in childhood, but lost with time long-lived plasma cells producing protective antibodies. While comparing the parameters of specific humoral immunity in groups with acute measles infection (day 6 from the onset of rash) and early convalescents (3 weeks after the onset of rash), it was shown that the level of specific IgG increased threefold in early convalescents ($p < 0.01$) compared with those at acute phase. The level of specific IgA, on the contrary, decreased from 73.44 (69–75.3) Me/ml to 48.64 (45–56.4) Me/ml, but remained very high. At the same time, the spectrum of specific IgG subclasses shifted from primary immune response (high IgG3 and low IgG1) to secondary response (low IgG3 and high IgG1), which is typical for the response of emerging memory B cells.

Key words: *measles, antibodies, IgG subclasses, vaccination, adults, primary immune response.*

Введение

Реализация программы ВОЗ по элиминации кори дала значительные результаты, однако в последние годы вновь отмечается рост заболеваемости этой инфекцией. Так, в 2018 г. корью в мире заболело 339 138 человек, а в 2019 г. — 429 650 человек [24]. Среди заболевших, помимо непривитых, выделяется группа (46%) привитых и даже получивших 2 дозы вакцины [17]. Известно, что примерно у 2–12% привитых от кори не развивается иммунный ответ на вакцинацию, что расценивают как первичные вакцинальные неудачи [20]. Еще 5% быстро теряют защитные уровни антител, что расценивается как вторичные вакцинальные неудачи [18]. Особенно настораживает увеличение количества серонегативных к кори молодых взрослых и возникновение вспышек кори среди даже дважды привитых взрослых [21]. Эти данные неоспоримо свидетельствуют о том, что в процессе жизни происходит постепенное истощение защитного уровня противокорревого иммунитета. Существуют генетические предпосылки к невысокому и непродолжительному иммунному ответу на корь, также он может быть обусловлен влиянием различных факторов среды. В международном научном сообществе обсуждаются причины субоптимального иммунного ответа на корь, ведется поиск предикторов такого

ответа и возможных подходов к коррекции этого явления [19, 23]. Однако все еще не ясно, насколько часто встречается потеря противокорревого иммунитета у привитых и как часто такие люди заболевают корью.

Целью настоящей работы было исследование особенностей специфического гуморального иммунного ответа на вирус кори у больных этой инфекцией и привитых от нее взрослых.

Материалы и методы

В исследование было включено 50 больных корью взрослых в возрасте от 20 до 55 лет, находившихся на стационарном лечении в 4-м инфекционном отделении ГБУЗ Инфекционная больница № 2 г. Москвы с февраля по апрель 2019 г. У всех больных диагноз был подтвержден клинически и лабораторно по наличию противокорревых IgM-антител. Группу сравнения составили 50 серонегативных к кори, условно здоровых взрослых, сопоставимых по возрасту с лицами основной группы, привитых культуральной живой коревой вакциной (Микроген, Россия) в прививочном кабинете ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Обследованные лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании. У всех 100 обследованных отсутствовали документы о проведенной в детском возрасте вакци-

нации. Кровь из локтевой вены в количестве 4 мл брали на 6 ± 1 день от появления сыпи у больных и через 6 недель после вакцинации у привитых. Полученную плазму крови разливали в пробирки «Эппендорф», замораживали и хранили при -70°C . Специфические антитела к кори и их avidность определяли методом ИФА с помощью коммерческого набора Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG (Euroimmun, Германия). Защитным уровнем IgG для кори считали показатель 0,2 МЕ/мл [22]. Для определения субклассов специфических IgG-антител применяли разработанную нами модификацию ИФА-метода [15]. Мы использовали покрытые антигенами кори 96-луночные панели из коммерческого набора для определения IgG-антител к кори (Euroimmun, Германия). Вместо анти-IgG конъюгата, входящего в набор, использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также анти-IgA моноклональные антитела (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл.

Результаты исследования подвергались статистической обработке с вычислением средней и ее ошибки ($M \pm SE$) в случае, если было доказано нормальное распределение признака, или с вычислением медианы, первого и третьего квартилей ($Me [LQ-HQ]$), если нормальность распределения не подтверждалась (программный пакет Microsoft Excel 10). Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

Распределение больных по возрасту оказалось неравномерным: 54% больных составили молодые люди 20–35 лет, 34% — люди среднего возраста и 12% — люди старше 46 лет (рис. 1). Среди серонегативных здоровых взрослых также преобладали молодые люди — 73%, лица среднего возраста составляли 19%, а люди старшей возрастной группы — 8%.

Ранее нами было показано, что по спектру субклассов специфических IgG-антител можно определить тип иммунной реакции на контакт

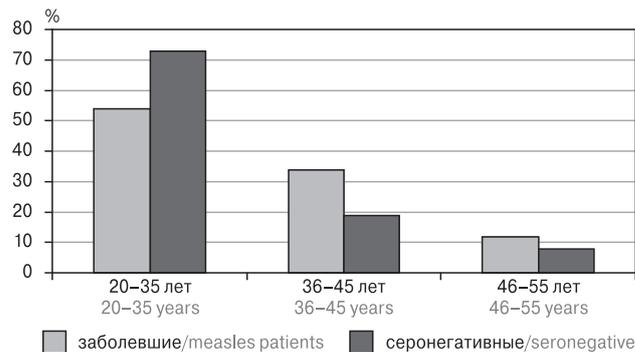


Рисунок 1. Распределение обследованных лиц по возрасту

Figure 1. Age distribution of the examined persons

с антигеном, т. е. установить, имели место первичный или вторичный иммунный ответ [12, 13]. На рис. 2 представлено распределение по субклассам специфических противокоревых антител у привитых (А) и больных корью (Б) взрослых. Из рисунка видно, что при первичном типе иммунного ответа, как у больных, так и у привитых, среди специфических антител преобладают IgG3-антитела, а при вторичном типе — IgG1-антитела. Интересно, что у 44% привитых был установлен первичный тип иммунного ответа на вакцинацию, а у 56% — вторичный. Среди заболевших корью 34% ответили первичным типом, а 66% — вторичным. Вторичный тип ответа как у привитых, так и у больных свидетельствует о том, что ранее эти люди были вакцинированы от кори, но утратили защитные антитела с возрастом.

Основные параметры противокорьевого гуморального ответа обследованных людей представлены в таблице. Из таблицы видно, что при заболевании корью на 6-й день после появления высыпаний уровень специфических IgA-антител на два порядка выше, чем через 6 недель после прививки, независимо от типа иммунного ответа. Уровень IgG-антител сопоставим в группах привитых с первичным и вторичным типами иммунного ответа. У больных корью уровень IgG-

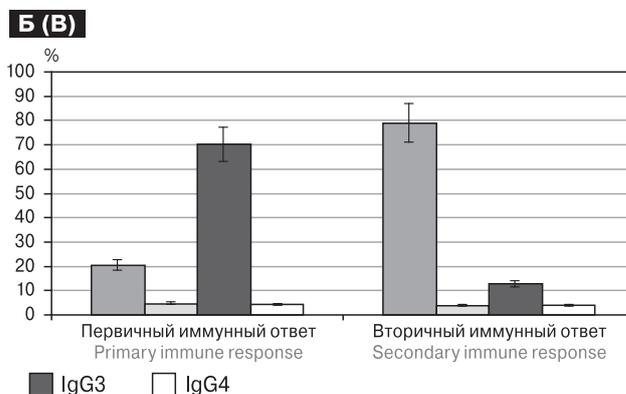
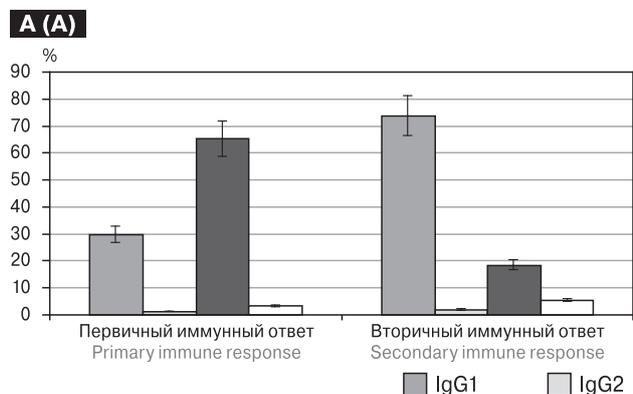


Рисунок 2. Распределение противокоревых IgG-антител по субклассам: А — привитые, Б — больные
Figure 2. Subclass distribution of measles IgG antibodies: A — vaccinated, B — measles patients

Таблица. Гуморальный иммунный ответ на вирусы кори Me (LQ–HQ)

Table. Humoral measles immune response Me (LQ–HQ)

		IgA, ME/мл IgA, ME/ml	IgG, ME/мл IgG, ME/ml	Авидность, % Avidity, %
Привитые Vaccinated subjects	Первичный иммунный ответ Primary immune response	0,78 (0,55–1,33)	1,17 (0,63–1,75)	33,6 (29,2–39,5)
	Вторичный иммунный ответ Secondary immune response	0,67 (0,49–0,94)	1,48 (0,89–1,87)	79,8 (75,4–83,9)
Больные Measles patients	Первичный иммунный ответ Primary immune response	44,2 (39,2–58,2)	0,71 (0,44–1,2)	28,5 (22,65–38,35)
	Вторичный иммунный ответ Secondary immune response	47,5 (37,9–59,6)	14,43 (5,47–29,71)	77,8 (60,7–96,2)

антител статистически значимо выше в группе с установленным вторичным типом иммунного ответа по сравнению с группой с первичным типом ($p < 0,001$). Авидность антител в группе с первичным типом иммунного ответа, как привитых, так и больных, была значимо ниже, чем в группе со вторичным типом ответа ($p < 0,05$).

У пяти пациентов, ответивших на инфекцию первичным типом иммунного ответа через 6 дней от момента появления сыпи, брали кровь также и через 3 недели от начала высыпаний по медицинским показаниям. В остаточных объемах плазмы крови были определены параметры противокорьевого гуморального иммунитета (рис. 3). Из рисунка видно, что у ранних реконвалесцентов в три раза возросло количество специфических IgG ($p < 0,01$) по сравнению с лицами с острой инфекцией. Уровень специфических IgA, напротив, снизился с 73,44 (69–75,3) ME/мл до 48,64 (45–56,4) ME/мл, оставаясь все еще очень высоким (на рисунке не показано). Интересно, что изменился спектр субклассов специфических IgG. Если в остром периоде инфекции он соответствовал первичному иммунному ответу (высокие IgG3 и низкие IgG1), то на этапе реконвалесценции спектр субклассов IgG поменялся на противоположный (низкие IgG3 и высокие IgG1), что типично для ответа формирующихся клеток памяти.

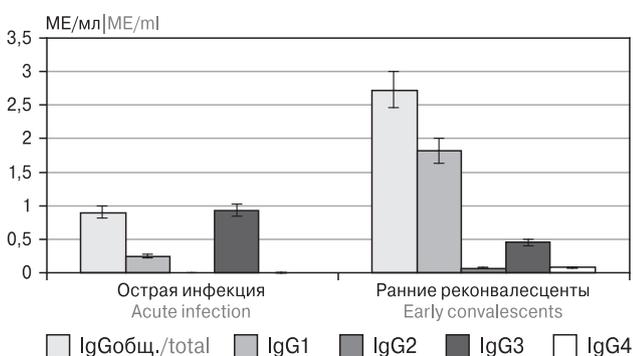


Рисунок 3. Сопоставление показателей гуморального иммунитета у больных острой коревой инфекцией и у ранних реконвалесцентов

Figure 3. Comparison of humoral immunity parameters in patients with acute measles infection and in early convalescents

Обсуждение

В результате проведенных исследований было показано, что люди в возрасте 20–35 лет чаще болеют корью, чем более взрослые лица. И именно в этой возрастной группе чаще встречаются серонегативные к кори здоровые индивиды. Похожие результаты были получены при исследовании влияния популяционного иммунитета к кори на заболеваемость этой инфекцией [4, 16]. Ранее было показано, что непривитые взрослые в острой фазе заболевания корью отвечают низкоавидными антителами преимущественно IgG3-субкласса (первичный иммунный ответ), а привитые взрослые в случае заболевания реагируют высокоавидными антителами IgG1-субкласса (вторичный иммунный ответ) [14]. Более чем у половины больных корью и привитых от этой инфекции здоровых серонегативных взрослых установлен вторичный тип иммунного ответа на контакт с вирусом кори, что следует из спектра субклассов и авидности специфических антител. Это свидетельствует о том, что указанные лица, по-видимому, были привиты в детстве от кори, но утратили со временем долгоживущие плазматические клетки, синтезирующие защитные антитела; факт утраты привитыми в детстве взрослыми защитных уровней антител отмечали и другие исследователи [3]. Однако у этих людей, вероятно, сохранились В-клетки памяти, которые сформировались при вакцинации в детстве и имели уже перестроенные IgG1-субкласса рецепторы преимущественно IgG1-субкласса. Похожие результаты были получены при оценке эффективности вакцинации против кори серонегативных взрослых в возрасте 18–30 лет [6]. При исследовании процессов созревания специфического гуморального иммунного ответа на прививку против кори у детей было показано, что с течением времени сформировавшийся первичный иммунный ответ (низкоавидные IgG3-антитела) замещаются высокоавидными IgG1-антителами [11]. Это связано с тем, что ранние короткоживущие плазматические клетки, синтезирующие низкоавидные IgG3-антитела, постепенно замещаются долгоживущими плазматическими клетками, для которых характерны высокоавидные IgG1-антитела [10]. В нашем исследовании

на ограниченной группе пациентов с подтвержденным первичным типом иммунного ответа, у которых спустя 6 дней и 3 недели от начала высыпаний были получены образцы сывороток крови, удалось продемонстрировать этот процесс переключения с раннего первичного IgG3-типа иммунного ответа на зрелый IgG1-тип, характерный для иммунологической памяти.

Тот факт, что у $2/3$ заболевших корью взрослых в острую фазу заболевания фиксируется вторичный тип иммунного ответа неоспоримо доказывает, что привитые в детстве могут заболеть и реально болеют корью во взрослом возрасте в случае утраты с возрастом защитных уровней антител. Проводимые популяционные исследования наличия защитных уровней противокоревых антител в различных возрастных группах показывают, что в возрастной группе 18–35 лет значимо возрастает количество серонегативных лиц [1, 7, 8, 16]. Это создает угрозу заболевания корью мо-

лодых взрослых, которые, кроме всего прочего, могут быть молодыми родителями, которые могут инфицировать своих маленьких, еще не привитых от кори детей. В то же время эта возрастная группа является наиболее мобильной, ее представители часто проживают в условиях тесно сплоченных коллективов (армейские казармы, студенческие и рабочие общежития). Такие серонегативные лица, попадая из небольших городов, где кори уже не было несколько лет, в большие города, например в Москву, где вспышки кори регистрируются ежегодно, контактируют с диким вирусом кори и заболевают. В связи с вышесказанным со всей очевидностью встает вопрос о необходимости определения уровней антител к вирусу кори у школьников 10–11 классов и проведения ревакцинации выявленных серонегативных. Вопрос о необходимости введения третьей дозы вакцины против кори активно обсуждается различными исследователями [2, 5, 9].

Список литературы/References

1. 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. [Kostinov M.P., Filatov N.N., Zhuravlev P.I., Gladkova L.S., Polishchuk 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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 129–136. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-LOM-690
2. 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 иммунологии*. 2016. № 5. С. 88–94. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Solovieva I.L., Savisko A.A., Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Cherdantsev A.P. Is a third dose of measles vaccine necessary — an immunologist's view. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 88–94. (In Russ.)]
3. Рубис Л.В. Результаты изучения коллективного иммунитета к кори у лиц в возрасте старше 35 лет // *Инфекция и иммунитет*. 2020. Т. 10, № 2. С. 381–386. [Rubis L.V. A survey of examining herd measles immunity in adults over 35 years old. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 381–386. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ASO-1302
4. Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Ермолович М.А., Глинская И.Н., Высоцкая В.С. Популяционный иммунитет к кори в республике Беларусь в условиях многолетней вакцинации // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020. Т. 19, № 1. С. 43–50. [Samoilovich E.O., Semeiko G.V., Yermalovich M.A., Glinskaya I.N., Vysotskaya V.S. Population immunity to measles in the Republic of Belarus following long-standing vaccination. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2020, vol. 19, no. 1, pp. 43–50. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-43-50
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 vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2011, no. 4, pp. 45–48. (In Russ.)]
6. Смердова М.А., Андреев Ю.Ю., Топтыгина А.П. Особенности иммунного ответа на вакцинацию против кори у серонегативных взрослых // *Российский иммунологический журнал*. 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 1021–1023. [Smerdova M.A., Andreev Yu.Yu., Toptygina A.P. Peculiarities of immune response to measles vaccination in seronegative adults. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, vol. 13 (22), no. 1, pp. 1021–1023. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006485-8
7. 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 Yu.Yu., Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., 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. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611
8. Сонис А.Г., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Ерещенко А.А., Игнатова Н.К., Кузьмичева В.И., Бородина И.А., Ненякин С.С. Характеристика напряженности противокорьевого иммунитета в зависимости от возраста // *Инфекция и иммунитет*. 2020. Т. 10, № 2. С. 375–380. [Sonis A.G., Gusyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Ershchenko A.A., Ignatova N.K., Kuzmicheva V.I., Borodina I.A., Nenjakin S.S. Pattern of resilient age-related measles immunity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 375–380. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-POR-1173
9. 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. [Sylka O.I., Kharseeva G.G., Leonova I.A. 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.)]

10. 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. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-7-14
11. Топтыгина А.П., Алешкин В.А. Созревание специфического гуморального ответа у детей, привитых вакциной «Приорикс». Иммунология. 2008. Т. 29, № 6. С. 350–353. [Toptygina A.P., Alioshkin V.A. Development of specific humoral reaction in children vaccinated with “Priorix” vaccine. *Immunologiya = Immunology*, 2008, vol. 29, no. 6, pp. 350–353 (In Russ.)]
12. 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. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-359-364
13. 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. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210005024-1
14. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 3. С. 243–250. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Peculiarities of specific humoral mesles immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 243–250. (In Russ.)] doi.org/10.15789/2220-7619-2013-3-243-250
15. 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., Pukhalsky A.L. Spectrum of anti-measles immunoglobulin G subclasses in convalescents after measles. *Byullyuten' eksperimental'noy biologii = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 259–261. (In Russ.)] doi: 10.1023/B:EBEM.0000031564.27747.b4
16. 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. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348
17. Cherry J.D., Zahn M. Clinical characteristics of measles in previously vaccinated and unvaccinated patients in California. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, vol. 67, no. 9, pp. 1315–1319. doi: 10.1093/cid/ciy286
18. Griffin D.E. Measles vaccine. *Viral Immunol.*, 2018, vol. 31, no. 2, pp. 86–95. doi: 10.1089/vim.2017.0143
19. Haralambieva I.H., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Schaid D.J., Poland G.A. Current perspectives in assessing humoral immunity after measles vaccination. *Expert Rev. Vaccines*, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 75–87. doi: 10.1080/14760584.2019.1559063
20. Mitchell L.A., Tingle A.J., Décarie D., Lajeunesse C. Serologic responses to measles, mumps, and rubella (MMR) vaccine in healthy infants: failure to respond to measles and mumps components may influence decisions on timing of the second dose of MMR. *Can. J. Public Health*, 1998, vol. 89, no. 5, pp. 325–328.
21. Seward J.F., Orenstein W.A. A rare event: a measles outbreak in a population with high 2-dose measles vaccine coverage. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 55, no. 3, pp. 403–405. doi: 10.1093/cid/cis445
22. Tischer A., Gassner M., Richard J.-L., Suter-Riniker F., Mankertz A., Heining 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. Voigt E.A., Ovsyannikova I.G., Haralambieva I.H., Kennedy R.B., Larrabee B.R., Schaid D.J., Poland G.A. Genetically defined race, but not sex, is associated with higher humoral and cellular immune responses to measles vaccination. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 41, pp. 4913–4919. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.060.
24. WHO. Measles and Rubella surveillance data. 2019. URL: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en (20.12.2019)

Авторы:

Топтыгина А.П., д.м.н., руководитель лаборатории цитокинов ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
Андреев Ю.Ю., аспирант ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Смердова М.А., аспирант ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Наврузова Л.Н., аспирант ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Малеев В.В., академик РАН, д.м.н., профессор, советник директора по научной работе ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Cytokines, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor of the Immunology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;
Andreev Yu.Yu., PhD Student, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Smerdova M.A., PhD Student, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Navruzova L.N., PhD Student, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Maleev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Advisor to the Director for Scientific Work, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К КОРИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ

Е.А. Кригер, О.В. Самодова

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск, Россия

Резюме. Медицинские работники — группа риска по контакту с больным и заболеванию корью. Инфицированные корью сотрудники учреждений здравоохранения могут способствовать внутрибольничному распространению кори и являться источником инфекции для наиболее уязвимого контингента пациентов: беременных женщин, новорожденных, больных с иммуносупрессией. С целью изучения гуморального иммунитета к кори у медицинских работников и факторов, влияющих на него, проведено поперечное исследование с включением 847 медицинских работников Архангельской областной клинической больницы. Количественное определение антител (иммуноглобулинов G) к вирусу кори проводилось методом иммуноферментного анализа «ВектоКорь-IgG» (Вектор-Бест, Россия). Согласно инструкции к набору, концентрация IgG выше 0,18 МЕ/мл считалась положительным результатом (условно защитный титр), уровень антител 0,12–0,17 МЕ/мл — сомнительным, а титр ниже 0,12 МЕ/мл — отрицательным. Оценка влияния на серологический статус сотрудника таких факторов, как пол, возраст, место работы (отделение), занимаемая должность, осуществлялась при помощи логистической регрессии для бинарной переменной отклика. Большинство участников исследования были женского пола (92,1%). Медиана возраста составила 48 (39; 57) лет. По числу обследованных преобладали сотрудники соматических отделений (26,7%). У 93,7% медработников концентрация антител к вирусу кори превышала условно защитный титр (выше 0,18 МЕ/мл), 4,4% были серонегативны к кори, а у 1,9% результат обследования был сомнительным. Уровень антител к кори зависел от возраста медработника и не зависел от пола. Все сотрудники старше 60 лет были серопозитивны к кори. Среди медработников моложе 35 лет только 77% имели условно защитные титры антител. Персонал в возрасте от 35 до 60 лет был серопозитивным в 95,5% случаев. Доля серонегативных к кори лиц не зависела от должности (врач, медицинская сестра, уборщик), но значительно варьировалась между отделениями, где работали участники исследования. По результатам логистической регрессии шансы серонегативного результата теста были в 4,4 раза выше у работников соматических отделений по сравнению с работниками других отделений. Среди сотрудников, родившихся в период с 1968 по 1984 г., серонегативные встречались в 10 раз реже, чем среди рожденных после 1985 г. Среди лиц старше 60 лет серонегативные сотрудники выявлялись в 50 раз реже, чем среди лиц младше 35 лет. Медиана концентрации IgG к кори в крови привитых медработников, 0,56 (0,23; 1,37) МЕ/мл, была статистически значимо ниже, чем у переболевших 4,2 (3,5; 5) МЕ/мл, $U = 137451$, $p < 0,001$. У обследованных в динамике сотрудников титр антител к кори за 5 лет снизился в среднем в 1,2–1,9 раза (в среднем — 1,5). Таким образом, в группе обследованных медицинских работников многопрофильной лечебной организации доля восприимчивых к кори составила 6,3%. Основным фактором, влияющим на уровень иммунитета, был возраст. Учитывая снижение поствакцинального иммунитета (в 1,5 раза за 5 лет), для предотвращения заноса кори в лечебно-профилактические организации необходимо проводить серомониторинг среди привитых медицинских работников не реже 1 раза в 5 лет с последующей ревакцинацией серонегативных.

Ключевые слова: иммунитет, корь, вакцинация, антитела, серопревалентность, медицинские работники.

Адрес для переписки:

Кригер Екатерина Анатольевна
163000, Россия, г. Архангельск, Троицкий пр., 51,
Северный государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (950) 963-57-11 (моб.).
E-mail: kate-krieger@mail.ru

Contacts:

Ekaterina A. Krieger
163000, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitski pr., 51,
Northern State Medical University.
Phone: +7 (950) 963-57-11 (mobile).
E-mail: kate-krieger@mail.ru

Для цитирования:

Кригер Е.А., Самодова О.В. Гуморальный иммунитет к кори у медицинских работников // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 523–529. doi: 10.15789/2220-7619-HIT-1452

Citation:

Krieger E.A., Samodova O.V. Measles humoral immunity in health-care workers // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 523–529. doi: 10.15789/2220-7619-HIT-1452

MEASLES HUMORAL IMMUNITY IN HEALTH-CARE WORKERS

Krieger E.A., Samodova O.V.

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation

Abstract. Healthcare-workers are at risk of contact with measles patients and disease transmission. Measles-infected employees of healthcare facilities may contribute to the nosocomial measles spread and serve as a source of infection for most susceptible cohorts such as pregnant women, neonates, and immunocompromised patients. In order to study the humoral immunity against measles in healthcare workers and reveal factors associated with seronegative status, we performed a cross-sectional study by enrolling 847 healthcare workers of the Arkhangelsk Regional Clinical Hospital. Anti-measles virus serum immunoglobulin G antibodies were quantified by using VectorMeasles-IgG ELISA kit (Vector-Best, Russia). According to the manufacturer's recommendations specific IgG anti-measles titer cut-off value higher than 0.18 IU/ml, equal to 0.12–0.17 IU/ml, or lower than 0.12 IU/ml was considered as positive (protective), equivocal, or negative, respectively. Assessing an impact of employee's gender, age, affiliation (department), current position was carried out by using binary logistic regression analysis while analyzing seronegative status of healthcare workers. Study participants dominated by females (92.1%). The median age was 48 (39; 57) years. The employees of somatic departments prevailed (26.7%). It was found that 93.7% of medical workers had concentration of anti-measles antibodies exceeding magnitude of protective titer (above 0.18 IU/ml), 4.4% and 1.9% were measles seronegative and equivocal, respectively. The level of antibodies against measles was associated with age of healthcare workers, but not with gender. All employees older than 60 years were measles seropositive, whereas those younger than 35 or within range 35 to 60 years of age had protective antibody titer in 77% and 95.5% of cases, respectively. The proportion of subjects with seronegative results did not depend on employee's position (doctor, nurse, cleaning worker), but varied a lot between different hospital departments. According to the data of logistic regression, the odds to have a seronegative test result among employees from somatic and remaining departments were 4.4-fold higher. Importantly, the rate of seronegative results was by 10-fold lower in employees born between 1968 and 1984 than those found in subjects born after 1985. On the other hand, subjects older than 60 years of age were seronegative at 50-fold lower rate than those who were under 35. The median concentration of measles immunoglobulin G among vaccinated healthcare workers vs. subjects recovered after natural infection was significantly lower reaching 0.56 IU/ml and 4.2 IU/ml ($p < 0.001$), respectively. Five-year monitoring showed that titer of measles IgG antibodies decreased by 1.2–1.9-fold (average — 1.5). Thus, a cohort of healthcare workers from multidisciplinary healthcare facility demonstrated that the proportion measles-susceptible subjects was 6.3%. Importantly, age of examined subjects mainly affected seronegative status. Taking into consideration age-related lowered serum antibody level in vaccinated healthcare workers, seroprevalence studies and subsequent revaccination of seronegative people should be performed at least once every 5 years to prevent measles spread in healthcare facilities.

Key words: immunity, measles, vaccination, antibodies, seroprevalence, health-care workers.

Введение

Корь — воздушно-капельная инфекция с высочайшей контагиозностью и вирулентностью. К кори восприимчивы все люди, не имеющие иммунитета к вирусу, вне зависимости от расы, возраста и пола. До введения вакцинации коллективный иммунитет к кори формировался за счет переболевших. Болели преимущественно дети, показатели заболеваемости приближались к цифрам рождаемости. Корь характеризовалась тяжелым течением и высокой летальностью, до 40% детей, заболевших в возрасте до 12 месяцев, умирали. Корь называли «детской чумой» [9].

Массовая вакцинация против кори в СССР была введена с 1967 г. для детей от 10 месяцев до 8 лет. В течение последующих 20 лет вакцина против кори вводилась однократно. График иммунизации претерпевал изменения в течение длительного времени, поскольку дети младше года давали недостаточный иммунный ответ на введение вакцины ввиду наличия материн-

ских антител, заболеваемость корью снизилась и сместилась на старшие возрастные группы, появилась новая категория заболевших — вакцинированные дети (старше 6 лет). Все это требовало корректировки графика проведения прививок. В 1986 г. был установлен оптимальный срок начала вакцинации в 12 месяцев, введена ревакцинация серонегативных детей в возрасте 6 лет, а с 1997 г. — ревакцинация всех детей в возрасте 6 лет [9]. Согласно Национальному календарю профилактических прививок, утвержденному приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации (РФ) № 125н от 2014 г., в настоящее время вакцинация против кори проводится в 12 месяцев, ревакцинация — детей в возрасте 6 лет; взрослых до 35 лет, не болевших, привитых однократно, не имеющих сведений о прививках против кори, взрослых из групп риска — до 55 лет. По эпидемическим показаниям вакцинация против кори проводится без ограничения возраста всем непривитым или привитым однократно лицам, не болевшим корью и имевшим контакт с больным [4].

В настоящее время коллективный иммунитет к кори формируется преимущественно за счет вакцинированных и в меньшей степени — за счет переболевших. Сезонные факторы не оказывают влияния на проявление эпидемического процесса. Для элиминации кори как самой контагиозной инфекции необходим высокий уровень охвата населения прививками (95–98%), в то время как глобальный охват населения первой дозой вакцины составляет 85%, а охват второй дозой вакцины — только 67% [6]. Кроме того, поствакцинальный иммунитет с возрастом утрачивается, и молодые взрослые становятся восприимчивыми к кори [7, 16]. По этим причинам элиминировать вирус пока не удается.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), за 2018 г. в странах Европейского региона было зарегистрировано 82 596 случаев кори, а в 2019 — 101 280, из них 78 700 случаев на Украине [3].

В РФ также отмечается тенденция к росту числа заболевших корью: в 2018 г. зарегистрировано 2539 случаев, а за первое полугодие 2019 г. — 3251 случай [3, 5]. Корь перестала быть детской инфекцией, более 44% заболевших составили взрослые, 77,8% из них не были привиты против кори.

Особую настороженность вызывает наличие восприимчивого к кори контингента среди медицинских работников. По результатам зарубежных исследований, риск заболевания корью медработников в 19 раз выше общепопуляционного [21]. В 2018 г. среди заболевших взрослых медицинские работники составили 6,2% (70 человек). Несмотря на то, что пропорция заболевших медиков невелика, инфицированные корью сотрудники учреждений здравоохранения могут способствовать внутрибольничному распространению кори, повышая риск инфекции для наиболее уязвимого контингента пациентов: беременных женщин, новорожденных, больных с иммуносупрессией [21].

Более половины заболевших медработников предоставили сведения о вакцинации против кори, что позволяет сделать предположение об утрате поствакцинального иммунитета с возрастом или предоставлении недостоверной информации. Из числа не привитых против кори и заболевших медработников 64,3% имели медицинские противопоказания к вакцинации, остальные не были вакцинированы по другим причинам [5].

В 2018 г. зарегистрированы заносы кори в 113 учреждений, оказывающих медицинскую помощь, в 34,5% из них произошло дальнейшее распространение инфекции с возникновением 210 внутрибольничных случаев, 29 из них — среди медицинского персонала [5].

В связи с напряженной эпидемиологической ситуацией по кори целью нашего исследования стало изучение гуморального иммунитета к кори у медицинских работников и факторов, влияющих на него.

Материалы и методы

Проведено поперечное исследование с включением 847 медицинских работников Архангельской областной клинической больницы (ГБУЗ АО АОКБ) — многопрофильного учреждения, оказывающего плановую, срочную, экстренную, специализированную и консультативно-диагностическую медицинскую помощь пациентам города Архангельска и Архангельской области по различным направлениям: кардиология, неврология, гастроэнтерология, пульмонология, ревматология, аллергология, гематология, нефрология, эндокринология, нейрохирургия, хирургия и др.

У 87 (10,3%) обследованных медицинских работников имелись результаты обследования на концентрацию антител к кори, проведенного в 2013–2014 гг. Таким образом, данное обследование было проведено повторно с интервалом в 5 лет. При опросе собирались сведения о возрасте, месте работы, должности участника, перенесенной ранее кори, проведенных профилактических прививках (документально подтвержденные). Количественное определение антител (иммуноглобулинов G [IgG]) к вирусу кори проводилось методом иммуноферментного анализа в лаборатории Архангельской областной клинической больницы с использованием набора реагентов «ВекторКорь-IgG» (Вектор-Бест, Россия).

В соответствии с инструкцией к набору, концентрация IgG выше 0,18 МЕ/мл считалась положительным результатом (условно защитный титр), уровень антител 0,12–0,17 МЕ/мл — сомнительным, а титр ниже 0,12 МЕ/мл — отрицательным.

При представлении результатов исследования качественные признаки выражались в виде процентных долей, а количественные — как медиана, первый и третий квартили [Me (Q1; Q3)]. Анализ качественных данных проводился с использованием теста хи-квадрат Пирсона, сравнение медиан проводилось с применением критерия Манна–Уитни. Оценка влияния на серологический статус сотрудника таких факторов, как пол, возраст, место работы (отделение), занимаемая должность, осуществлялась при помощи логистической регрессии для бинарной переменной отклика. В качестве зависимой переменной рассматривался серологический статус работника: серонегативные кодировались как 1, серопозитивные — как 0. Учитывалось,

как изолированное (нескорректированное отношение шансов [ОШ]), так и взаимное влияние совокупности изучаемых факторов (скорректированное ОШ). Вычисления проводились с помощью пакета статистических программ SPSS, v.23 (IBM, США).

Результаты

Среди включенных в исследование медработников ($n = 847$) 30,1% составили врачи, 51,8% — медицинские сестры, 18,1% — уборщики помещений. Большинство участников исследования были женского пола (92,1%). Медиана возраста составила 48 (39; 57) лет. Преобладали сотрудники соматических отделений (26,7%). В акушерских отделениях работали 13,1% участников, в хирургических — 12,6%, в инфекционных — 10,9%, в отделениях новорожденных — 10,5%, в реанимационных — 6,5%, в отделении функциональной диагностики — 6,4%. Работники лабораторий составили 13,3%.

У 93,7% медработников концентрация антител к вирусу кори превышала условно защитный титр (выше 0,18 МЕ/мл), 4,4% были серонегативны к кори, а у 1,9% был получен сомнительный результат обследования. Уровень антител к кори зависел от возраста медработника ($\chi^2_{(4)} = 89,3$, $p < 0,001$) и не зависел от пола ($\chi^2_{(2)} = 2,2$, $p < 0,33$). Все сотрудники старше 60 лет были серопозитивны к кори. Среди медработников

моложе 35 лет только 77% имели условно защитные титры антител. Персонал в возрасте от 35 до 60 лет был серопозитивным в 95,5% случаев. Доля серонегативных к кори лиц не зависела от должности — врач, медицинская сестра, уборщик ($\chi^2_{(4)} = 0,61$, $p = 0,96$), но значительно варьировалась между отделениями, в которых работали участники исследования ($\chi^2_{(12)} = 25,0$, $p = 0,03$). Наибольший процент серонегативных медработников выявлен в соматических отделениях (7,1%), при этом средний возраст работников и доля лиц моложе 35 лет в соматических отделениях не отличалась от таковых в других отделениях стационара ($U = 702\ 210$, $p = 0,518$).

По результатам логистической регрессии шансы серонегативного результата теста были в 4,4 раза выше у работников соматических отделений, чем у работников других отделений (табл.). Среди сотрудников, родившихся в период с 1968 по 1984 г., серонегативные встречались в 10 раз реже, чем среди рожденных после 1985 г. Среди лиц старше 60 лет серонегативные сотрудники выявлялись в 50 раз реже, чем среди лиц младше 35 лет.

О перенесенном ранее заболевании сообщили 29,9% участников исследования. Практически все из них (99,6%) были старше 35 лет, 73,4% родились ранее 1967 г., с которого началась массовая иммунизация против кори. Только три человека смогли подтвердить факт заболевания корью документально, так как абсолютное большинство

Таблица. Факторы, определяющие серонегативный статус медицинского работника

Table. Variables associated with seronegative status among healthcare workers

Факторы Variables	Нескорректированное ОШ* (95% ДИ*) Crude OR* (95% CI*)	Значение p p-value	Скорректированное ОШ (95% ДИ) Adjusted OR (95% CI)	Значение p p-value
Пол/Gender				
Мужской/Male	1,9 (0,8; 4,3)	0,15	3,0 (1,0; 8,9)	0,05
Женский/Female	группа сравнения reference group		группа сравнения reference group	
Год рождения/Year of birth				
≤ 1967	0,03 (0,01; 0,09)	< 0,01	0,02 (0,0; 0,08)	< 0,01
1968–1984	0,16 (0,08; 2,96)		0,12 (0,06; 0,24)	
≥ 1985	группа сравнения reference group		группа сравнения reference group	
Должность/Occupation				
Врач/Doctor	группа сравнения reference group	0,94	группа сравнения reference group	0,38
Медсестра/Nurse	0,9 (0,5; 1,7)		1,7 (0,8; 3,6)	
Уборщица/Cleaning worker	0,9 (0,4; 2,0)		1,6 (0,6; 4,3)	
Отделение/Department				
Соматическое/Somatic	3,1 (1,8; 5,4)	< 0,01	4,4 (2,3; 8,3)	< 0,01
Другое/Others	группа сравнения reference group		группа сравнения reference group	

Примечание. * ОШ — отношение шансов, ДИ — доверительные интервалы.

Note. *OR — odds ratio, CI — confidence intervals.

перенесли заболевание в детстве. Уровень антител к кори у переболевших медработников был выше условно защитного и варьировал от 0,9 до 5,5 МЕ/мл. У 92,1% из них концентрация IgG к кори была выше 3 МЕ/мл.

Доля медицинских работников, предоставивших документально подтвержденные сведения о двукратной вакцинации, составила 15,3%. Более 95% из них были моложе 40 лет (95,4%). С момента последней ревакцинации против кори прошло в среднем 16 (8; 20) лет. У привитых в детстве медработников уровень антител варьировал от 0 до 5,1 МЕ/мл, но у 79,8% он был ниже 3 МЕ/мл, а у 48,5% — ниже 1 МЕ/мл. Медиана концентрации IgG к кори в крови привитых медработников, 0,56 (0,23; 1,37) МЕ/мл, была статистически значимо ниже, чем у переболевших — 4,2 (3,5; 5) МЕ/мл, $U = 137451$, $p < 0,001$.

У обследованных в динамике 87 сотрудников титр антител к кори за 5 лет снизился в среднем в среднем в 1,5 раза (в 1,2–1,9 раза).

Обсуждение

Доля медработников, восприимчивых к кори, составила 6,3%. Наибольший процент серонегативных сотрудников выявлен среди лиц моложе 35 лет (23%) и работников соматических отделений (7,1%). Установлено, что уровень антител у привитых сотрудников был значительно ниже, чем у переболевших, и снизился в среднем в 1,5 раза за 5 лет.

Результаты нашего исследования сопоставимы с данными аналогичного исследования, проведенного во Франции, где доля серонегативных медработников составила 6,5% [11]. Доля лиц, восприимчивых кори в Архангельской области, превышала показатели, зарегистрированные в Италии (2,8%) и Турции (1,4%), но была значительно ниже, чем в Японии (8,2%), Австралии (8,5%) и Саудовской Аравии (13%) [10, 12, 15, 19, 22]. Подобное исследование, проведенное в Москве, также выявило более высокий процент серонегативных работников медицинских организаций [2].

Многими исследователями отмечается зависимость серологического статуса от возраста. Так, наиболее восприимчивой к кори признается группа молодых взрослых, среди которых отмечается сравнительно высокий процент лиц, утративших гуморальный иммунитет, приобретенный после вакцинации, проведенной в детстве [11]. С увеличением возраста доля серонегативных снижается, а среди лиц старше 60 лет приближается к нулю [2]. Это обусловлено тем, что сотрудники, родившиеся до введения массовой вакцинации, приобретали в результате перенесенной инфекции более

стойкий иммунитет к кори, не имеющий тенденции к снижению концентрации IgG с течением времени [13,14, 20]. У лиц, родившихся после начала вакцинальной компании, иммунитет к кори формировался как в результате инфицирования вирусом, так и посредством специфической профилактики. Большинство работников, родившихся в период с 1967 по 1985 г., привиты от кори однократно, однако имеют более высокие титры антител, чем более молодые сотрудники. Встреча с диким вирусом кори, продолжавшим в то время циркулировать в популяции, оказывала бустерный эффект и приводила к увеличению уровня антител к инфекции [17].

Молодые сотрудники, получившие двукратную вакцинацию в детстве, вероятнее всего, не сталкивались с диким вирусом кори в связи со значительным снижением уровня заболеваемости в 1980–1990-х гг. И следовательно, бустеризации иммунитета не происходило, что привело к снижению концентрации антител и повышению восприимчивости к кори. Это подтверждается результатами исследований, согласно которым заболевшие корью взрослые часто отвечали на инфекцию вторичным иммунным ответом, свидетельствующим о наличии у них клеток памяти, появившихся в результате вакцинации и сохранившихся несмотря на снижение уровня специфических антител в крови [17]. Сохранение клеток памяти у привитых в детстве способствует более легкому течению кори, но тем не менее заболевшие сотрудники могут представлять опасность ввиду возможного распространения заболевания в лечебном учреждении [7].

В отличие от уровня антител у переболевших сотрудников, уровень антител у привитых снижался с течением времени, что отмечается и другими авторами. Так, исследование, проведенное в Люксембурге, показало, что концентрация антител к кори у ранее привитых уменьшалась на 2,4% в год [18]. Высокая концентрация антител к кори у переболевших объясняется нестерильным иммунитетом, пожизненной персистенцией дефектных форм вируса в лимфоидной ткани [1].

Таким образом, в группе обследованных медицинских работников многопрофильной лечебной организации доля восприимчивых к кори составила 6,3%. Основным фактором, влияющим на уровень иммунитета, был возраст. Учитывая снижение поствакцинального иммунитета (в 1,5 раза за 5 лет), для предотвращения заноса кори в лечебно-профилактические организации необходимо проводить серомониторинг среди привитых медицинских работников не реже 1 раза в 5 лет с последующей ревакцинацией серонегативных.

Список литературы/References

1. Зуев В.А. Медленные инфекции человека и животных // Вопросы вирусологии. 2014. Т. 59, № 5. С. 5–12. [Zuev V.A. Slow infections of humans and animals. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2014, vol. 59, no. 5, pp. 5–12. (In Russ.)]
2. Костинов М.П., Филатов Н.Н., Журавлев П.И., Гладкова Л.С., Полишук В.Б., Шмитько 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. [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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 129–136. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-LOM-690
3. О ситуации по заболеваемости корью // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. [On the measles morbidity. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 2019. (In Russ.)]. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13353 (08.04.2020)
4. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2014 г. № 125н. [On approval of the national immunization schedule and immunization schedule for epidemic prevention: Order of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation of 21st March, 2014, no. 125n. (In Russ.)] URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_162756/ (08.04.2020)
5. Об эпидемиологической ситуации по кори и краснухе в 2018 году: письмо Роспотребнадзора от 30.07.2019 № 02/10901-2019-32. М.: Роспотребнадзор, 2018. [On the epidemiological situation of measles and rubella, 2018: Paper of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor) of 30.07.2019 no. 02/10901-2019-32. Moscow: Rospotrebnadzor, 2018 (In Russ.)]. URL: https://rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=12345 (08.04.2020)
6. План стратегического реагирования на чрезвычайную ситуацию, вызванную циркуляцией кори в Европейском регионе ВОЗ. Сентябрь 2019 г. — декабрь 2020 г. Женева: ВОЗ, 2019. 24 с. [Strategic response plan for the measles emergency in the WHO European Region. September 2019 — December 2020. Geneva: WHO, 2019. 24 p. (In Russ.)]
7. 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. [Topotygina 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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 137–144. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-FOH-1334
8. 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. [Topotygina 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. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348
9. Цвиркун О.В., Тихонова Н.Т., Ющенко Г.В., Герасимова А.Г. Эпидемический процесс кори в разные периоды ее вакцинопрофилактики // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 14, № 2. С. 80–87. [Tsvirkun O.V., Tihonova N.T., Yushchenko G.V., Gerasimova A.G. Measles epidemic process in various vaccinal periods. *Epidemiologia i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, vol. 14, no. 2, pp. 80–87. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-2-80-87
10. Almuneef M.A., Memish Z.A., Balkhy H.H., Otaibi B., Helmi M. Seroprevalence survey of varicella, measles, rubella, and hepatitis A and B viruses in a multinational healthcare workforce in Saudi Arabia. *Infect Control Hosp. Epidemiol.*, 2006, vol. 27, pp. 1178–1183. doi: 10.1086/508826
11. Botelho-Nevers E., Cassir N., Minodier P., Laporte R., Gautret P., Badiaga S., Thiberville D.J., Ninove L., Charrel R., Brouqui P. Measles among healthcare workers: a potential for nosocomial outbreaks. *Euro Surveill*, 2011, vol. 16, no. 2, pp. 1–5. doi: 10.2807/ese.16.02.19764-en
12. Celikbas A., Ergonul O., Aksaray S., Tuygun N., Esener H., Tanir G., Eren S., Baykam N., Guvener E., Dokuzoguz B. Measles, rubella, mumps, and varicella seroprevalence among health care workers in Turkey: is prevaccination screening cost-effective? *Am. J. Infect. Control*, 2006, vol. 34, pp. 583–587. doi: 10.1016/j.ajic.2006.04.213
13. Christenson B., Bottiger M. Measles antibody: comparison of long-term vaccination titres, early vaccination titres and naturally acquired immunity to and booster effects on the measles virus. *Vaccine*, 1994, vol. 12, no. 2, pp. 129–133. doi: 10.1016/0264-410X(94)90049-3
14. Davidkin I., Valle M. Vaccine-induced measles virus antibodies after two doses of combined measles, mumps and rubella vaccine: a 12-year follow-up in two cohorts. *Vaccine*, 1998, vol. 16, no. 20, pp. 2052–2057. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00081-4
15. Fedeli U., Zanetti C., Saia B. Susceptibility of healthcare workers to measles, mumps rubella and varicella. *J. Hosp. Infect.*, 2002, vol. 51, pp. 133–135. doi: 10.1053/jhin.2002.1222
16. Hayman D.T.S. Measles vaccination in an increasingly immunized and developed world. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2019, vol. 15, no. 1, pp. 28–33. doi: 10.1080/21645515.2018.1517074
17. Hope K., Boyd R., Conaty S., Maywood P. Measles transmission in health care waiting rooms: implications for public health response. *Western Pac. Surveill. Response J.*, 2012, vol. 3, no. 4, pp. 33–38. doi: 10.5365/WPSAR.2012.3.3.009
18. Kremer J.R., Schneider F., Muller C.P. Waning antibodies in measles and rubella vaccinees — a longitudinal study. *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 14, pp. 2594–2601. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.12.015

19. Kumakura S., Shibata H., Onoda K., Nishimura N., Matsuda C., Hirose M. Seroprevalence survey on measles, mumps, rubella and varicella antibodies in healthcare workers in Japan: sex, age, occupational-related differences and vaccine efficacy. *Epidemiol. Infect.*, 2014, vol. 142, no. 1, pp. 12–19. doi: 10.1017/S0950268813000393
20. Pebody R.G., Gay N.J., Hesketh L.M., Vyse A., Morgan-Capner P., Brown D.W., Litton P., Miller E. Immunogenicity of second dose measles-mumps-rubella (MMR) vaccine and implications for serosurveillance. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 7–8, pp. 1134–1140. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00435-2
21. Steingart K.R., Thomas A.R., Dykewicz C.A., Redd S.C. Transmission of measles virus in healthcare settings during a community-wide outbreak. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 1999, vol. 20, no. 2, pp. 115–199. doi: 10.1086/501595
22. Vagholkar S., Ng J., Chan R.C., Bunker J.M., Zwar N.A. Healthcare workers and immunity to infectious diseases. *Aust. NZ J. Public Health*, 2008, vol. 32, pp. 367–371. doi: 10.1111/j.1753-6405.2008.00257.x

Авторы:

Кригер Е.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;

Самодова О.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия.

Authors:

Krieger E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;

Samodova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.04.2020
Принята к печати 17.05.2020

Received 10.04.2020
Accepted 17.05.2020

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ IgG-АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ БЕЛКАМ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЛАЗ (ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ И ЦЕНТРАЛЬНОЙ СЕРОЗНОЙ ХОРИОРЕТИНОПАТИИ)

В.В. Нероев¹, Г.И. Кричевская¹, Г.И. Алаторцева², М.В. Рябина¹, А.П. Сарыгина¹, Л.Н. Нестеренко², В.В. Доценко², Л.Н. Лухверчик²

¹ ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) и центральная серозная хориоретинопатия (ЦСХ) — заболевания заднего отрезка глаза, нередко приводящие к снижению зрительных функций. Их патогенез во многом неясен. Среди факторов риска развития хронического воспаления рассматривают различные микроорганизмы, в частности *Cytomegalovirus*. Цель исследования — анализ гуморального ответа на индивидуальные белки *CMV* у пациентов с ВМД и ЦСХ в условиях хронической *CMV*-инфекции и ее реактивации. **Материалы и методы.** Обследовано 104 пациента, серопозитивных к *CMV*: 75 — с ВМД и 29 — с ЦСХ. В иммуноферментном анализе определяли IgM- и IgG-антитела к поздним вирусным антигенам, а также IgG-антитела к основному неструктурному предраннему антигену *CMV* (IE). В линейном иммуноанализе определяли IgG-антитела к индивидуальным антигенам *CMV*: основному неструктурному предраннему белку (IE), ДНК-связывающему фосфопротеину pp52, фосфопротеинам тегумента pp150, pp65, pp28. Использовали рекомбинантные антигены IE, p52, p150, p65, p28, содержащие иммунодоминантные белковые фрагменты вирусных антигенов. Учитывали положительные (интенсивность окрашивания линии — 2+) и сильно положительные результаты (интенсивность окрашивания линии — 3+). **Результаты.** У пациентов с хронической *CMV*-инфекцией частота выявления антител к индивидуальным антигенам в обеих группах была сопоставима. Уровень серопозитивности к p150 и p65 был существенно выше, чем к p52 и p28. У пациентов с ВМД, в отличие от пациентов с ЦСХ, достоверно преобладал умеренно положительный ответ (2+) на все исследуемые антигены. При реактивации хронической *CMV*-инфекции у больных с ВМД повышался уровень серопозитивности ко всем антигенам, увеличивалось число случаев с интенсивно положительным ответом на отдельные антигены, но по-прежнему преобладал умеренно положительный ответ. В группе с ЦСХ реактивация хронической *CMV*-инфекции отмечена всего у 6 пациентов, что не позволяет провести сравнительный анализ между этими двумя группами. **Заключение.** Основное различие между пациентами с ВМД и ЦСХ, хронически

Адрес для переписки:

Кричевская Галина Исааковна
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19,
ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца
Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 624-57-13 (служебн.), 8 985 191-92-34 (моб.).
E-mail: gkri@yandex.ru

Contacts:

Galina I. Krichevskaya
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19., Helmholtz National Medical Research
Center of Eye Diseases.
Phone: +7 (495) 624-57-13 (office), +7 985 191-92-34 (mobile).
E-mail: gkri@yandex.ru

Для цитирования:

Нероев В.В., Кричевская Г.И., Алаторцева Г.И., Рябина М.В., Сарыгина А.П., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Лухверчик Л.Н. Особенности продукции IgG-антител к индивидуальным белкам цитомегаловируса при различных заболеваниях глаз (возрастной макулярной дегенерации и центральной серозной хориоретинопатии) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 530–538. doi: 10.15789/2220-7619-FOI-1424

Citation:

Neroev V.V., Krichevskaya G.I., Alatorseva G.I., Ryabina M.V., Sarygina A.P., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Likhverchik L.N. Features of IgG-antibodies production to individual Cytomegalovirus proteins in various eye diseases (age-related macular degeneration and central serous chorioretinopathy) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 530–538. doi: 10.15789/2220-7619-FOI-1424

инфицированными *CMV*, состояло не в частоте выявления антител к разным рекомбинантным антигенам, а в интенсивности иммунного ответа: у пациентов с ВМД, в отличие от больных с ЦСХ, превалировала умеренная продукция (2+) антител. Существенное различие касалось уровня антител к p150: при ВМД преобладал умеренный антителыный ответ (2+), а при ЦСХ — интенсивно положительный (3+) ($p < 0,05$). Возможно, умеренно выраженный синтез антител к исследованным рекомбинантным антигенам *CMV* у пациентов с ВМД отражает слабую экспрессию вирусных антигенов в условиях хронической инфекции, в результате чего длительно поддерживается антигенная стимуляция, приводящая к продолжительному воспалению.

Ключевые слова: цитомегаловирус, вирусные белки, антитела, линейный иммуноанализ, возрастная макулярная дегенерация, центральная серозная хориоретинопатия.

FEATURES OF IgG-ANTIBODIES PRODUCTION TO INDIVIDUAL CYTOMEGALOVIRUS PROTEINS IN VARIOUS EYE DISEASES (AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY)

Neroev V.V.^a, Krichevskaya G.I.^a, Alatortseva G.I.^b, Ryabina M.V.^a, Sarygina A.P.^a, Nesterenko L.N.^b, Dotsenko V.V.^b, Lkhverchik L.N.^b

^a Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

^b I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Age-related macular degeneration (AMD) and central serous chorioretinopathy (CSC) are diseases targeting the posterior segment of the eye that often lead to lowered visual functions. Pathogenesis of such disorders largely remains unclear. Among the risk factors of developing chronic inflammation, various microorganisms are considered, particularly *Cytomegalovirus* (*CMV*). The study was aimed at analyzing the humoral response to individual viral proteins during chronic and reactivated *CMV* infection in AMD and CSC patients. **Materials and methods.** 104 *CMV*-seropositive patients were enrolled in the study including 75 AMD and 29 CSC subjects. IgM- and IgG-antibodies specific to *CMV* late viral antigens as well as IgG antibodies against the main non-structural immediate early (IE) antigen were evaluated by ELISA. IgG antibodies to individual *CMV* phosphoproteins such as the main non-structural immediate early protein (IE), the DNA-binding phosphoprotein pp52, and the tegument phosphoproteins (pp150, pp65, and pp28) were assessed by using Line-Immunoassay: recombinant antigens containing immunodominant protein fragments derived from viral antigens (p52, p150, p65, p28) were used. Positive (bands 2+) and strongly positive (bands 3+) data were only used for analysis. **Results.** It was shown that in both groups patients with chronic *CMV* infection had comparable rate of detected antibodies specific to individual antigens. The level of seropositivity to *CMV* p150 and p65 was significantly higher than that to *CMV* p52 and p28 ($p < 0.05$). Patients with AMD compared to patients with CSC had significantly higher moderate positive response (2+) to all the antigens examined. Upon reactivation of chronic *CMV* infection in AMD patients, the level of seropositivity to all antigens was increased, the number of cases with an intensely positive response to individual antigens was elevated, but patients with moderate positive response still prevailed. However, reactivation of chronic *CMV* infection was observed only in 6 CSC patients, allowing to perform no comparative analysis between these two groups. **Conclusion.** The main difference between *CMV*-chronically infected patients with AMD and CSC was not found at the level of seropositivity to individual *CMV* recombinant antigens, but rather in magnitude of antibody production so that AMD patients in comparison to CSC patients displayed moderate antibody production (bands 2+). A marked difference was related to the level of antibodies against *CMV* p150: AMD patients showed moderate antibody response (bands 2+), whereas CSC subjects dominated with strong positive response (bands 3+) ($p < 0.05$). It seems that moderate antibody production to recombinant *CMV* antigens examined in AMD patients occurs due to a weak expression of such viral antigens during chronic infection, resulting in long-term maintenance of antigenic stimulation leading to prolonged inflammation.

Key words: *CMV*, viral proteins, antibodies, line-immunoassay, age-related macular degeneration, central serious chorioretinopathy.

Введение

Cytomegalovirus (*CMV*, *Human betaherpesvirus 5*) длительное время ассоциировали в основном с внутриутробной офтальмопатологией и тяжелыми ретинитами у пациентов с выраженным иммунодефицитом. Усовершенствование методов лабораторной диагностики расширило представления о клинических проявлениях *CMV* — заболеваниях глаз. Установлена этиологическая роль этого вируса при некоторых воспалитель-

ных заболеваниях переднего и заднего отрезка глаза не только у иммунокомпрометированных, но и у иммунокомпетентных людей. В настоящее время обсуждается роль *CMV*, наряду с другими микроорганизмами, при возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и центральной серозной хориоретинопатии (ЦСХ) [1, 2, 13].

ВМД — тяжелое инвалидизирующее заболевание, одна из главных причин потери зрения у лиц старшего возраста. После 50 лет ее удельный вес в структуре глазной патологии

неуклонно растет [1, 2, 5, 6]. Напротив, ЦСХ долгое время считалась болезнью преимущественно молодых мужчин. В последние годы появились сообщения об увеличении доли женщин в структуре заболеваемости ЦСХ, расширении возрастных рамок возникновения ЦСХ, развитии хронических форм заболевания со значительным и необратимым снижением зрительных функций [7, 8].

Для ВМД и ЦСХ характерно поражение сосудов хориоидеи (при ВМД отмечается истончение сосудистой оболочки, а при ЦСХ ее утолщение), пигментного эпителия сетчатки, а при ВМД — еще и фоторецепторов. Патогенез ВМД и ЦСХ сложен и во многом неясен. Однако в настоящее время известно, что при ЦСХ главную роль играет воспаление, а при ВМД воспалительные изменения сочетаются с дегенеративными изменениями, связанными с возрастом [8, 10]. Полагают, что хроническое воспаление, вызванное инфекциями, может быть одним из факторов риска, способствующих возникновению и прогрессированию ВМД и ЦСХ. Получены данные о роли вирусов герпеса человека, в частности *Herpes simplex viruses* и *CMV*, в развитии ВМД и ЦСХ [1, 2, 9, 12]. В большинстве случаев заключение о возможном влиянии *CMV* на возникновение и прогрессирование ВМД и ЦСХ основано на выявлении у пациентов повышенных титров гуморальных специфических антител [5, 13]. Первичная *CMV*-инфекция характеризуется появлением IgM-антител, низкоавидных IgG-антител, антител к предраннему антигену вируса, на смену которым приходят высокоавидные IgG-антитела к поздним вирусным антигенам (маркеры хронической инфекции).

Современная серодиагностика *CMV*-инфекции направлена в большинстве случаев на выявление противовирусных IgG- и IgM-антител без уточнения их антигенной специфичности. Раннее инфицирование и пожизненная персистенция вируса в организме хозяина обуславливает высокую серопозитивность популяции к *CMV* (IgG-антитела к поздним структурным белкам *CMV* определяются у 85–95% населения всего земного шара), причем при рецидиве глазного заболевания их титр меняется незначительно либо вообще не меняется. По нашим данным, рецидивы *CMV*-заболеваний глаз очень редко сопровождаются появлением IgM- или IgG-низкоавидных антител, для них более характерна продукция IgG-антител к предраннему неструктурному (IE) антигену ЦМВ.

CMV — наиболее крупный герпесвирус, в его состав входит большое количество белков [11, 12, 16, 17]. Как и все вирусы герпеса человека, он имеет сложное строение. Двухцепочечная ДНК упакована в белковую оболочку (капсид), при выходе из инфицированной клетки вирион по-

крывается суперкапсидом — наружной липопротеиновой оболочкой, содержащей некоторые компоненты клетки-хозяина. Между капсидом и наружной оболочкой (суперкапсидом) расположен аморфный белковый слой, называемый тегументом (tegument) или матриксом. Вирусные белки представлены в разных слоях вириона, они все принимают участие в репродукции *CMV*, однако в настоящее время основное внимание к себе привлекают белки тегумента, в частности p65, p150 и p28. Эти белки вовлечены во все стадии жизненного цикла *CMV*: внедрение вируса в клетку-хозяина, экспрессию вирусных генов, уклонение от иммунного надзора, сборку вириона и выход вирусных частиц из клетки [12, 17]. В частности, именно с p65 связывают способность *CMV* ускользать как от врожденного, так и приобретенного иммунного ответа хозяина, что обеспечивает его пожизненную персистенцию в организме человека [11, 16, 17].

Показано, что состав экспрессируемых вирусных белков отличается на разных стадиях *CMV*-инфекции (ЦМВИ). Исследование антител к индивидуальным антигенам ЦМВ позволяет уточнить фазу инфекции (первичную, хроническую, латентную), что нашло применение в клинической практике [3, 14].

Однако не ясно, имеется ли взаимосвязь между экспрессией отдельных белков *CMV* и особенностями клинической симптоматики заболеваний глаз.

Цель данного исследования — изучение гуморального иммунного ответа на различные высокоспецифичные рекомбинантные белки *CMV* у пациентов с ВМД и ЦСХ в условиях хронической инфекции и ее реактивации.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 2 группы пациентов: 1 группа — 80 человек с ВМД (возраст — 43–85 лет, ср. возраст — 70, 7 лет), 2 группа — 33 человека с ЦСХ (возраст — 28–64 года, ср. возраст — 42 года). Всем больным проведено тщательное офтальмологическое обследование.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Кровь из локтевой вены брали при первом обращении пациентов в институт. В сыворотках крови определяли IgG- и IgM-антитела к *CMV* без уточнения их антигенной специфичности. Использовали наборы реагентов «ВектоЦМВ-IgM» и «ВектоЦМВ-IgG» («Вектор-Бест», Россия). Реактивацию хронической ЦМВИ диагностировали по наличию в сыворотке крови IgG-антител к основному предраннему неструктурному антигену ЦМВ (тест-система «БиоСет-актив-ЦМВ», «Биосервис», Россия). ИФА осуществляли на автоматическом анализаторе «Лазурит» (США) в соответствии с ин-

струкциями производителя. Результаты учитывали по разнице оптической плотности (ОП) сыворотки пациента и контрольной отрицательной сыворотки (ДОП).

Линейный иммуноанализ (ЛИА). Одновременно с ИФА сыворотки исследовали методом линейного иммуноанализа. Определяли IgG-антитела к индивидуальным рекомбинантным антигенам (АГ) ЦМВ, полученным в НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова: основному неструктурному предраннему белку IE (IE), неструктурному предраннему ДНК-связывающему белку p52 (p52), белкам тегумента: p150, p65, p28. Белки тегумента CMV являются фосфопротеинами (pp). Полученные в бактериальной системе экспрессии рекомбинантные АГ содержали только высокоспецифичные для ЦМВ иммунодоминантные белковые фрагменты вирусных антигенов (p).

Рекомбинантные АГ IE, p65, p150, p28, p52 сорбировали на полосках (стрипах) нитроцеллюлозной мембраны в виде индивидуальных линий. Отрицательным контрольным антигеном служила β -галактозидаза *E. coli*, контролем правильности проведения реакции — иммунная сыворотка к IgG человека. Комплекс «антитело—рекомбинантный АГ» детектировали с помощью пероксидазного конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Результаты ЛИА учитывали визуально по появлению и степени окрашивания линий в области нанесения отдельных антигенов в реакции с сывороткой крови каждого пациента в сопоставлении с контрольными положительными и отрицательными антигенами. Содержание специфических антител к рекомбинантным полипептидам CMV в исследуемых сыворотках оценивали полуколичественно и выражали в условных единицах, «плюсах»: отсутствие линии — отрицательный результат (–), очень слабое окрашивание — сомнительный результат (\pm), слабое окрашивание — слабopоложительный результат (1+), умеренное окрашивание — положительный результат (2+), интенсивное окрашивание — сильноположительный результат (3+) [3].

Статистическая обработка осуществлялась с помощью программы Biostat, с использованием критерия Пирсона (χ^2) и точного критерия Фишера. Определяли частоту выявления признака (%), среднее значение (M), стандартное отклонение от среднего (Σ).

Результаты

Определение IgG-, IgM-антител к CMV и IgG-антител к предраннему антигену CMV в ИФА. Серонегативными к ЦМВ и исключенными из дальнейшего исследования оказались 9 па-

циентов (5 с ВМД и 4 с ЦСХ). У 104 пациентов (75 с ВМД, 29 с ЦСХ) в сыворотке крови обнаружены IgG-антитела к CMV и не выявлены IgM-антитела, что свидетельствовало о наличии хронической ЦМВИ (ХЦМВИ). Среднее значение ДОП IgG-антител у пациентов с ВМД составляло $2,7 \pm 0,62$, с ЦСХ — $2,7 \pm 0,56$ ($p > 0,05$).

IgG-антитела к предраннему IE-антигену выявлены в ИФА у 31 из 75 (41,3%) обследованных с ВМД и 6 из 29 (20,7%) с ЦСХ. При ВМД наличие маркеров реактивации ХЦМВИ отмечено в 2 раза чаще, чем при ЦСХ, однако разница статистически не достоверна ($p = 0,07$). Не обнаружено также существенных различий в средних показателях ДОП IgG-антител к предраннему IE антигену: ВМД — $1,6 \pm 0,75$, ЦСХ — $2,4 \pm 0,8$ ($p > 0,05$). По результатам ИФА в каждой группе выделили 2 подгруппы: а) пациенты с ХЦМВИ без серологических маркеров реактивации (1а, 2а); б) пациенты с серологическими маркерами реактивации ХЦМВИ (1б, 2б).

Особенности продукции антител к антигенам CMV в условиях хронической инфекции (группы 1а, 2а). Оценка диагностической значимости слабopоложительных линий (1+) неоднозначна, поэтому при анализе результатов ЛИА мы учитывали только явно положительные результаты (интенсивность окраски 2+ и 3+). У подавляющего большинства пациентов с ВМД и ЦСХ в ЛИА выявлены антитела (интенсивность 2+ и 3+) к p150 и p65, реже — к p28 и p52. Уровень серопозитивности к индивидуальным антигенам ЦМВ в обеих группах существенно не различался ($p > 0,05$), хотя антитела к p150, p65 и p28 при ЦСХ обнаруживались несколько чаще, чем при ВМД (табл. 1, рис. 1А, 2А).

У пациентов с ВМД и ЦСХ четко положительные результаты (линии 2+ и 3+) обнаружены в ЛИА к рекомбинантным АГ p150 у 79 и 87% ($p > 0,05$), p65 у 72 и 83% ($p > 0,05$), p28 у 52 и 47% ($p > 0,05$) и к p52 у 47 и 43% ($p > 0,05$) обследованных соответственно (табл. 1; рис. 1А, 2А). Антитела к рекомбинантному АГ IE в ЛИА не обнаруживались (табл. 1, рис. 1А, 2А).

В обеих группах больных в условиях ХЦМВИ IgG-антитела (2+ и 3+) к белку p150 встречались достоверно чаще, чем к p52 и p28 ($p < 0,05$). Существенных различий в частоте выявления IgG-антител к p150 и p65 не обнаружено ($p > 0,05$) (табл. 1, рис. 1А, 2А).

У пациентов с ВМД, серопозитивных к белкам p150, p65, p52 и p28, на все исследованные рекомбинантные АГ существенно чаще выявлен умеренно положительный ответ (2+). При ЦСХ, напротив, умеренно положительный ответ (2+) достоверно преобладал только на антиген p65 ($p < 0,05$), а на p150 чаще отмечен интенсивно положительный ответ (линии 3+) ($p < 0,05$) (табл. 1, рис. 1А, 2А).

Таблица 1. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ВМД и ЦСХ, хронически инфицированных CMV (линейный иммуноанализ)

Table 1. Detection rate (%) of IgG-antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in chronically CMV-infected AMD and CSC patients (Line Immunoassay)

Интенсивность окраски полос Intensity of band staining	Всего обследовано (n) Total examined (n)		IE n (%)		p150 n (%)		p52 n (%)		p65 n (%)		p28 n (%)		
	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	
	3+	44	23	0	0	9 (20)	12 (52)	5 (11)	4 (17)	5 (11)	3 (13)	4 (9)	5 (22)
2+	0			0	26 (59)	8 (35)	16 (36)	6 (26)	27 (61)	16 (70)	19 (43)	8 (35)	
P					< 0,001			< 0,006		< 0,001	< 0,001	< 0,001	
2+и 3+	0			0	35 (79)	20 (87)	21 (47)	10 (43)	32 (72)	19 (83)	23 (52)	13 (57)	

Примечания. n (%) — число пациентов (%), серопозитивных к данному рекомбинантному антигену; p — статистически значимые различия в частоте выявления линий с интенсивностью окрашивания 2+ и 3+ к данному рекомбинантному антигену.

Notes. n (%) — number (%) of patients seropositive for specific recombinant antigen; p — statistically significant difference in rate of detected bands with 2+ and 3+ staining intensity to specific recombinant antigen.

Особенности продукции антител к индивидуальным антигенам CMV в условиях реактивации хронической инфекции (группы 1Б, 2Б). При реактивации CMV у пациентов с ВМД по сравнению с больными с ХЦМВИ повышается частота выявления антител (линии 2+ и 3+) ко всем исследованным рекомбинантным АГ. В целом достоверное увеличение серопозитивных лиц установлено для рекомбинантных АГ IE — 84% и 0 (p < 0,05); p52 — 81 и 47% (p < 0,05); p65 — 97 и 72% (p < 0,05); недостоверное для p150 — 94 и 79% (p > 0,05) и p28 — 74 и 52% (p > 0,05) соответственно.

Хотя у больных с ВМД при реактивации ХЦМВИ (табл. 2, рис. 2Б) по-прежнему преоб-

ладает умеренно положительный ответ на все антигены (2+), число пациентов с интенсивным ответом (3+), по сравнению с ХЦМВИ, возрастает, и существенные различия сохраняются только для рекомбинантных АГ IE, p52 и p65 (p < 0,05) (табл. 2, рис. 1Б, 2Б).

При реактивации ХЦМВИ у пациентов с ЦСХ (2б) выявлялся преимущественно высокий уровень антител (линии 3+) к рекомбинантным АГ IE, p150, p52, p28, а к рекомбинантному АГ p65 одинаково часто встречались линии с интенсивностью окраски как 2+, так и 3+. Учитывая ограниченное число наблюдений в этой группе (6 пациентов), отмеченная тенденция требует дальнейшего подтверждения.

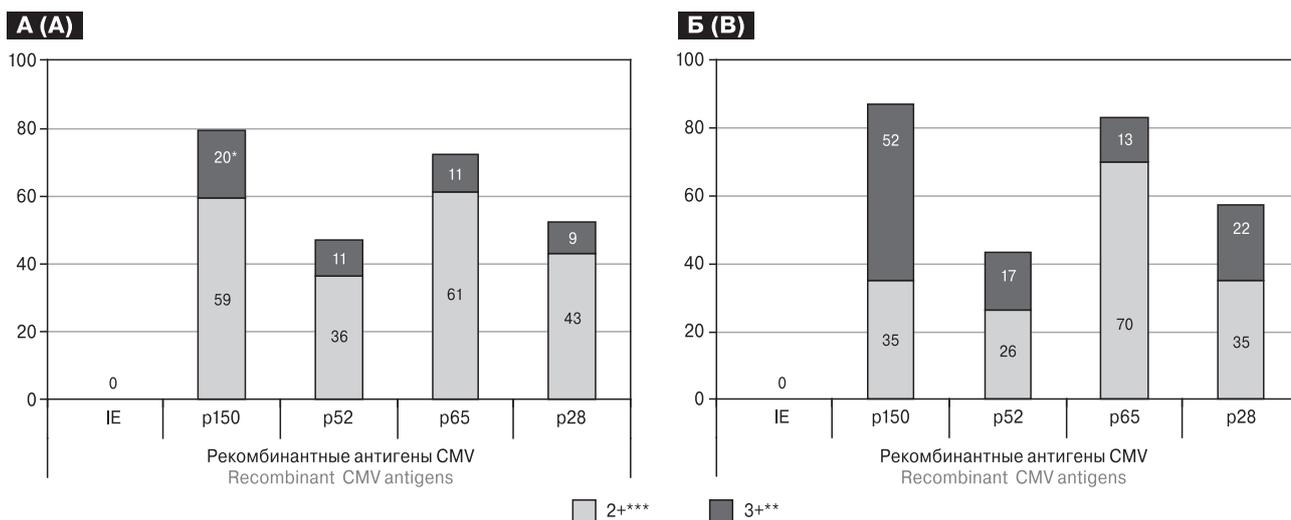
**Рисунок 1. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ВМД (1а) и ЦСХ (2а), хронически инфицированных CMV (линейный иммуноанализ)**

Figure 1. Detection rate (%) of IgG antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in patients with AMD (1a) and CSC (2a), chronically infected with CMV (Line Immunoassay)

Примечания. * — частота выявления антител, %; ** — линии с интенсивностью окраски 3+; *** — линии с интенсивностью окраски 2+.

Notes. * — detection rate of IgG — antibodies, %; ** — bands with 3+ staining intensity; *** — bands with 2+ staining intensity.

Таблица 2. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ЦСХ и ВМД с серологическими маркерами реактивации хронической CMV-инфекции (линейный иммуноанализ)

Table 2. Detection rate (%) of IgG-antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in CMV-infected AMD and CSC patients with serological reactivation markers (Line Immunoassay)

Интенсивность полос Intensity of band staining	Всего обследовано (n) Total examined (n)		IE n (%)		p150 n (%)		p52 n (%)		p65 n (%)		p28 n (%)	
	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC
3+	31	6	4 (13)	2	11 (36)	4	8 (26)	4	11 (36)	3	9 (29)	2
2+			22 (71)	1	18 (58)	0	17 (55)	1	19 (61)	3	14 (45)	0
p			< 0,001				< 0,020		< 0,043			
2+ и 3+			26 (84)	3	29 (94)	4	25 (81)	5	30 (97)	6	23 (74)	2

Примечания. n (%) — число пациентов, серопозитивных к данному рекомбинантному антигену; p — статистически значимые различия в частоте выявления линий с интенсивностью окрашивания 2+ и 3+ к данному рекомбинантному антигену.

Notes. n (%) — number (%) of patients seropositive for specific recombinant antigen; p — statistically significant difference in rate of detected bands with 2+ and 3+ staining intensity to specific recombinant antigen.

Обсуждение

В настоящее время изучается роль индивидуальных белков герпесвирусов не только в стадии активной вирусной инфекции, но и при хронической форме. Показано, что при инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, некоторые белки вируса длительно персистируют после купирования острой фазы инфекции, о чем свидетельствует продолжительный синтез антител к раннему антигену (ЕА).

В состав вириона CMV входит большое количество белков, каждый из которых играет опре-

деленную роль в его репликации. Экспрессия генов CMV, как и других герпесвирусов, регулируется по принципу каскада: синтез предранних белков «включает» процесс репликации и индуцирует экспрессию генов, кодирующих ранние и поздние белки.

Хорошо изучена динамика синтеза антител к индивидуальным белкам CMV при первичной инфекции и реактивации хронической, что часто используется в клинической практике для определения стадии инфекции. В то же время не ясно, связана ли клиническая симптоматика CMV-ассоциированных заболеваний с особенностями

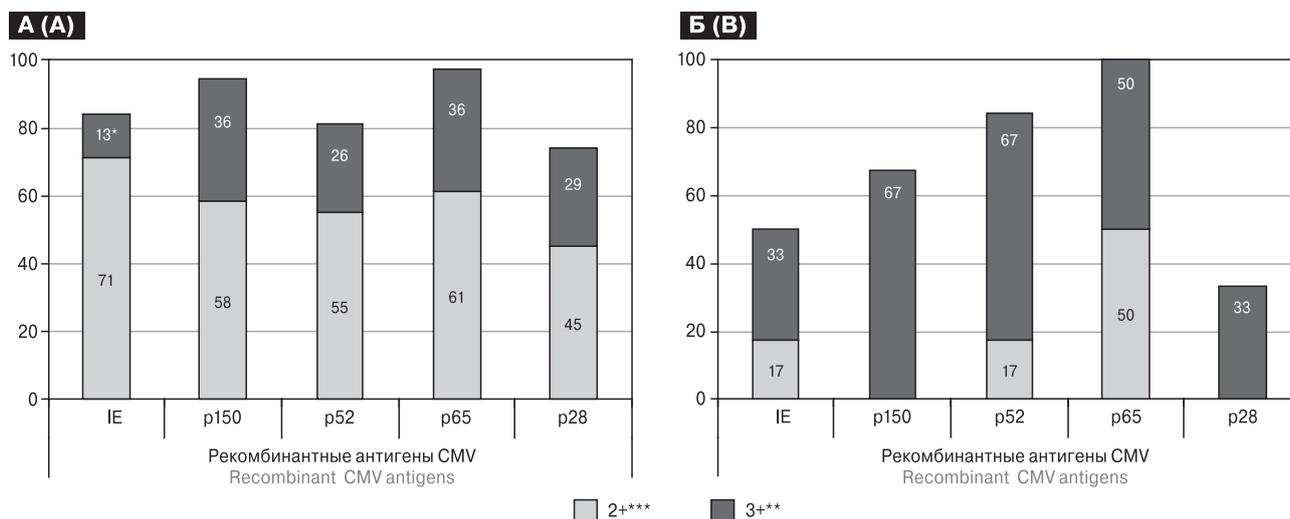


Рисунок 2. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ВМД (1а) и ЦСХ (2а) с серологическими маркерами реактивации хронической CMV-инфекции (линейный иммуноанализ)

Figure 2. Detection rate (%) of IgG antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in patients with AMD (1a) and CSC (2a) and serological markers of reactivated chronic CMV-infection (Line Immunoassay)

Примечания. * — частота выявления антител в %; ** — линии с интенсивностью окраски 3+; *** — линии с интенсивностью окраски 2+.

Notes. * — Detection rate of IgG — antibodies, %; ** — bands with 3+ staining intensity; *** — bands with 2+ staining intensity.

экспрессии индивидуальных вирусных антигенов. С целью изучения такой взаимозависимости были обследованы 2 группы серопозитивных к ЦМВ пациентов с тяжелыми заболеваниями заднего отрезка глаза: с ВМД и ЦСХ.

С помощью ЛИА определяли IgG-антитела к индивидуальным антигенам *СМV*, используя рекомбинантные антигены IE, p150, p65, p52, p28.

IE — предранний белок, маркер активной литической инфекции. Экспрессия предранних генов запускает процесс репликации вируса и приводит к экспрессии генов, кодирующих ранние и поздние белки. У обследованных нами пациентов с ВМД и ЦСХ IgG-антитела к этому антигену в ЛИА выявлялись только у серопозитивных в ИФА пациентов. В группе с ВМД и реактивацией ХЦМВИ преобладали пациенты с умеренно положительным синтезом антител (линии 2+) ($p < 0,05$), что отражало, по-видимому, слабую репликацию вируса, недостаточную для возникновения характерных для активной ЦМВИ изменений в сетчатке.

Малочисленность пациентов с ЦСХ и реактивацией ХЦМВИ (6 человек) не позволяет провести в этой группе сравнительный анализ интенсивности синтеза антител к разным белкам, включая IE. Необходимы дальнейшие наблюдения.

Фосфопротеин pp65 является мажорным белком тегумента. Антитела к рекомбинантному АГ p65 выявлены у большинства пациентов с ВМД как в условиях ХЦМВИ (72%), так и при ее реактивации (97%). У пациентов с ЦСХ, хронически инфицированных *СМV*, антитела к p65 обнаружены в 83% случаев, а при реактивации — у всех обследованных. При ХЦМВИ как при ВМД, так и при ЦСХ достоверно преобладает умеренный уровень антител к рекомбинантному АГ p65, что, по-видимому, обеспечивает выполнение его основной функции — ускользание вируса от иммунного ответа хозяина.

Отмеченное при реактивации ХЦМВИ увеличение числа серопозитивных к p65 пациентов в обеих группах также, вероятно, связано с необходимостью обеспечить вирусу условия для репликации у иммунокомпетентных лиц [10, 11, 17].

Высокоиммуногенный фосфопротеин pp150 относят к капсидным белкам тегумента из-за его тесной связи с капсидом. Среди белков тегумента по количеству он занимает второе место после pp65. Этот белок необходим для продуктивной репликации вируса, поддержания стабильности капсидов, упаковки капсидов в вирусные частицы и направления их к месту «одевания» в наружную оболочку.

В условиях хронической ЦМВИ наиболее выраженные различия у пациентов с ВМД и ЦСХ обнаружены нами в уровне антител к рекомби-

нантному АГ p150. Уровень серопозитивности к рекомбинантному АГ p150 у пациентов обеих групп достоверно не различался (хотя и был выше при ЦСХ) и составлял в группе с ВМД 79%, а ЦСХ — 87% обследованных. Полученные результаты согласуются с литературными данными о наличии антител к этому белку у большинства людей с острой и ХЦМВИ [9]. Однако в группе с ЦСХ преобладал интенсивный положительный ответ, а в группе ВМД — умеренно положительный ($p < 0,05$).

Разницу в интенсивности антителообразования к белку pp150 можно было бы объяснить возрастным снижением иммунного ответа у пациентов с ВМД, которые в среднем старше пациентов с ЦСХ на 20 лет. Недаром ВМД относят к заболеваниям, связанным со старением. Однако полученные нами результаты ИФА противоречат подобному заключению: средние показатели противовирусных IgG-антител к поздним антигенам и предраннему антигену *СМV* в этих двух группах обследованных существенно не отличались.

Возможно, у пациентов с ВМД, хронически инфицированных ЦМВ, по сравнению с больными с ЦСХ, увеличивается образование неинфекционных покрытых оболочкой вирусоподобных частиц (non-infectious enveloped particles), вызывающих длительное, но более слабое, чем инфекционные вирионы, воспаление и менее интенсивный синтез антител к pp150 [11, 16, 17].

В наших исследованиях в группе с ВМД и реактивацией ХЦМВИ повышалось число пациентов с интенсивным уровнем антител к рекомбинантному АГ p150, хотя сохранялась тенденция к преобладанию умеренно положительного ответа. Малочисленность группы больных с ЦСХ и реактивацией ХЦМВИ не позволяет провести сравнительный анализ с группой пациентов с ВМД.

Фосфопротеин pp28 — высокоиммуногенный белок тегумента, функции которого во многом сходны с функциями pp150. Однако предполагается, что белок pp28 в большей степени ответствен за выход вируса из клетки. Среди пациентов с ВМД и реактивацией ХЦМВИ отмечено увеличение числа лиц с антителами к рекомбинантному АГ p28 с 57 до 74% ($p < 0,05$), что согласуется с современными представлениями о важной роли белков тегумента в усилении экспрессии предранних генов ЦМВ, необходимых для запуска продуктивной инфекции, а также о роли pp28 в выходе инфекционных вирионов из клетки [11, 15].

Фосфопротеин pp52 — ДНК-связывающий белок *СМV*. Отмечено достоверное повышение числа пациентов с наличием IgG-антител к рекомбинантному АГ p52 при реактивации ВМД

по сравнению с показателями группы больных с ХЦМВИ ($p < 0,05$). Полученные результаты согласуются с данными Nulens E. и соавт. о взаимозависимости выявления IgG-антител к pp52 и присутствия IgM-антител к ЦМВ [13, 17].

Таким образом, в условиях ХЦМВИ пациенты с ВМД отличались от больных с ЦСХ не специфической направленностью и частотой положительного антительного ответа на индивидуальные белки *CMV*, а его интенсивностью. У пациентов с ВМД преобладает умеренно положительный ответ на все исследованные антигены: линии с интенсивностью окрашивания 2+ встречаются достоверно чаще по сравнению с линиями 3+ ($p < 0,05$), а при ЦСХ умеренно положительный ответ (2+) существенно чаще встречается только на белок pp65. Наиболее

выраженные отличия выявлены для рекомбинантного АГ р150: при ЦСХ достоверно преобладает интенсивный положительный ответ ($p < 0,05$), а при ВМД — умеренно положительный (табл. 1, рис. 1А, 2А).

Возможно, умеренно выраженный уровень антител к исследованным рекомбинантным АГ ЦМВ у пациентов с ВМД отражает слабую экспрессию вирусных антигенов в условиях хронической инфекции, в результате чего длительно поддерживается антигенная стимуляция, приводящая к продолжительному воспалению. Необходимы дальнейшие наблюдения для оценки влияния экспрессии отдельных антигенов ЦМВ на развитие хронического воспаления и для уточнения роли такого воспаления в патогенезе ВМД.

Список литературы/References

1. Алексеев И.Б., Нам Ю.А., Непесова О.М. Патогенетические особенности развития дистрофических процессов сетчатки при миопии и возрастной макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал. 2017. Т. 10, № 4. С. 90–96. [Aleksseev I.B., Nam Ju.A., Nepesova O.M. Pathogenetic issues of retinal dystrophies associated with myopia and age-related macular degeneration. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2017, vol. 10, no. 4, pp. 90–96. doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-4-90-96 (In Russ.)]
2. Игнат'ев С.А., Алексеев И.Б., Чернакова Г.М., Клещева Е.А., Нам Ю.А. Возрастная макулярная дегенерация и цитомегаловирус: дискуссионные аспекты патогенеза // Российский офтальмологический журнал. 2015. Т. 8, № 4. С. 71–78. [Ignat'ev S.A., Aleksseev I.B., Chernakova G.M., Kleshheva E.A., Nam Ju.A. Age-related macular degeneration and the cytomegalovirus: controversial issues of pathogenesis. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2015, vol. 8, no. 4, pp. 71–78 (In Russ.)]
3. Марданлы С.С., Арсеньева В.А., Захаров М.В., Марданлы С.Г., Амелина Е.А., Ротанов С.В. Применение линейного иммуноблоттинга для скрининга антител класса G и M к основным возбудителям TORCH-инфекций // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 3, № 82. С. 59–65. [Mardanly S.S., Arsen'eva V.A., Zaharov M.V., Mardanly S.G., Amelina E.A., Rotanov S.V. The linear immunoblotting for screening antibodies of class G and M to the immunodominant pathogens of TORCH. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 59–65. doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-3-59-65 (In Russ.)]
4. Мирзабекова К.А. Центральная серозная хориоретинопатия — современные подходы к лечению // Вестник офтальмологии. 2012. № 6. С. 62–64. [Mirzabekova K.A. Central serous chorioretinopathy — uptodate treatment options. *Vestnik oftal'mologii = Herald of Ophthalmology*, 2012, no. 6, pp. 62–64. (In Russ.)]
5. Мухамедьянова А.Ш., Азнабаев Р.А., Азнабаева Л.Ф. Клинические и иммунологические факторы возникновения и течения возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. 2014. Т. 130, № 3. С. 9–12. [Mukhamedyayanova A.Sh., Aznabaev R.A., Aznabaeva L.F. Clinical and immunological factors of the onset and development of age-related macular degeneration. *Vestnik oftal'mologii = Herald of Ophthalmology*, 2014, vol. 130, no. 3, pp. 9–12. (In Russ.)]
6. Нероев В.В. Российское наблюдательное эпидемиологическое неинвертеционное исследование пациентов с влажной формой макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал. 2011. Т. 4, № 2. С. 4–9. [Neroev V.V. Russia's nationwide epidemiological noninvasive study of patients with wet age-related macular degeneration. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2011, vol. 4, no. 2, pp. 4–9. (In Russ.)]
7. Нероев В.В., Рябина М.В., Цапенко И.В., Зуева М.В., Чиковани К.Р. Клинико-функциональные особенности различных форм центральной серозной хориоретинопатии // Российский офтальмологический журнал. 2011. Т. 4, № 1. С. 52–57. [Neroev V.V., Ryabina I.V., Tsapenko M.V., Zueva K.R. Chikovani Clinical and functional features of various forms of central serous chorioretinopathy. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 52–57. (In Russ.)]
8. Нероев В.В., Цапенко И.В., Зуева М.В., Рябина М.В., Чиковани К.Р. Морфофункциональные изменения сетчатки и ретинального пигментного эпителия у больных центральной серозной хориоретинопатией на фоне длительной системной стероидной терапии // Российский офтальмологический журнал. 2012. Т. 5, № 3. С. 34–38. [Neroev V.V., Tsapenko I.V., Zueva M.V., Ryabina M.V., Chikovani K.R. Structural and functional changes of the retina and retinal pigment epithelium in patients with central serous chorioretinopathy receiving prolonged systemic steroid therapy. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2012, vol. 5, no. 3, pp. 34–38. (In Russ.)]
9. Никитина А.В., Помелова В.Г., Соколова М.В., Осин Н.С., Марданлы С.Г. Выбор антигенов для определения иммуноглобулина G к цитомегаловирусу на основе технологии ФОСФАН // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 10. С. 36–39. [Nikitina A.V., Pomelova V.G., Sokolova M.V., Osin N.S., Mardanly S.G. The selection of antigens for detecting of immunoglobulin G to cytomegalovirus on the basis of FOSFAN technology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 10, pp. 36–39. (In Russ.)]

10. Слепова О.С., Еремеева Е.А., Рябина М.В., Сорожкина Е.С. Роль инфекции в патогенезе возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. 2015. Т. 131, № 4. С. 56–59. [Slepova O.S., Ereemeeva E.A., Ryabina M.V., Sorozhkina E.S. Role of infection in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Vestnik oftalmologii = The Russian Annals of Ophthalmology*, 2015, vol. 131, no. 4, pp. 56–59. (In Russ.)] doi: 10.17116/ofialma2015131456-59
11. Biolatti M., Dell’Oste V., De Andrea M., Landolfo S. The human cytomegalovirus tegument protein pp65(pUL83): a key player in innate immune evasion. *New Microbiologica*, 2018, vol. 41, no. 2, pp. 87–94.
12. Kalejta R.F. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008, vol. 72, no. 2, pp. 249–265. doi: 10.1128/VVBR.00040-07
13. Miller D.M., Espinosa-Heidmann D.G., Legra J., Dubovy S.R., Süner I.J., Sedmak D.D., Dix R.D., Cousins S.W. The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2004, vol. 138, no. 3, pp. 323–28. doi: 10.1016/j.ajo.2004.03.018
14. Nulens E., Bodéus M., Bonelli F., Soleti A., Goubau P. Reactivity to p52 and CM2 recombinant proteins in primary human cytomegalovirus infection with a microparticle agglutination assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 4, pp. 536–539. doi: 10.1128/cdli.7.4.536-539.2000
15. Pepperl S., Münster J., Mach M., Harris J.R., Plachter B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, no. 13, pp. 6132–6146. doi: 10.1128/jvi.74.13.6132-6146.2000
16. Smith R.M., Kosuri S., Kerry J.A. Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 582–605. doi: 10.3390/v6020582
17. Tomtishen J.P. 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol. J.*, 2012, vol. 9: 22. doi: 10.1186/1743-422X-9-22
18. Varnum S.M., Streblov D.N., Monroe M.E., Smith P., Auberry K.J., Pasa-Tolic L., Wang D., Camp D.G. 2nd, Rodland K., Wiley S., Britt W., Shenk T., Smith R.D., Nelson J.A. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 20, pp. 10960–10966. doi: 10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004

Авторы:

Нероев В.В., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Кричевская Г.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Алаторцева Г.И., к.б.н., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Рябина М.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Сарыгина А.П., младший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Нестеренко Л.Н., к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Доценко В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Лухверчик Л.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Neroev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Director of the Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Krichevskaya G.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Alatortseva G.I., PhD (Biology), Head of the Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Ryabina M.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Sarygina A.P., Junior Researcher, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Nesterenko L.N., PhD (Chemistry), Leading Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Dotsenko V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Lukhverchik L.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ И ПРЕДИКЦИЯ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ КОИНФЕКЦИИ ВИЧ И ТУБЕРКУЛЕЗА

Н.В. Мальцева, И.Б. Викторова, О.М. Казанцева, С.В. Архипова, А.Л. Ханин

Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новокузнецк, Россия

Резюме. Поиск прогностических маркеров коинфекции ВИЧ и туберкулез (ВИЧ/ТБ), особенно при множественной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* (МЛУ МБТ), ассоциированной с низкими показателями излечения ТБ, является актуальным в связи с проблемой выбора адекватных противотуберкулезных мер, способных снизить уровень летальности. Обследованы 113 больных ВИЧ/ТБ в возрасте от 24 до 58 лет (70 мужчин и 43 женщины), находившихся на стационарном лечении в Новокузнецком клиническом противотуберкулезном диспансере в период с 2017 по 2019 гг. МЛУ МБТ (резистентность одновременно к изо니아зиду и рифампицину) обнаружена у 50 пациентов (31 мужчина и 19 женщин) в возрасте от 24 до 54 лет. У 12 больных с МЛУ МБТ имелась дополнительная резистентность к фторхинолонам. В группу контроля включено 49 практически здоровых лиц в возрасте от 27 до 72 лет (26 женщин и 23 мужчины), не имеющих признаков очаговой и системной инфекции с умеренно выраженными возрастными изменениями. В образцах плазмы крови методом твердофазного иммуноферментного анализа определены концентрации общих (неспецифических) иммуноглобулинов классов E, M, G, A (в том числе секреторного иммуноглобулина A, sIgA). Для статистической обработки результатов использованы пакеты лицензионных программ InStatII, Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 22. Выявлен большой интервал индивидуальной вариабельности количества CD4-лимфоцитов как среди умерших, так и среди живущих обследованных пациентов с ВИЧ/ТБ, что является недостатком использования этого показателя для предикции летальности. Установлено, что содержание общих IgE, IgM, IgG, IgA и sIgA в плазме крови больных ВИЧ/ТБ выше в сравнении с контролем, а у умерших больных концентрация IgE и sIgA больше, чем у живущих. Установлен коэффициент предикции (КП) исхода заболевания для пациентов с ВИЧ/ТБ и МЛУ МБТ, равный отношению произведения концентраций IgE, IgM, IgA и секреторного IgA в плазме крови к количеству CD4-лимфоцитов ($KП = \text{IgE} \times \text{IgM} \times \text{IgA} \times \text{sIgA} / \text{CD4}$). КП более 200 был выявлен у 77% умерших и 6% живущих пациентов. Относительный риск летального исхода при $KП > 200$ оказался очень высоким ($OR = 56,7, p < 0,0001$) и был в 8,5 раз выше, чем при $CD4 < 200$ ($OR = 6,7, p = 0,0237$). Выявленная положительная корреляционная связь КП с летальным исходом более значима, чем у показателя CD4. Представленные результаты позволяют предложить КП в качестве эффективного прогностического критерия при ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ для клинического использования.

Ключевые слова: коинфекция ВИЧ/туберкулез, предикция, исход заболевания, летальность, IgE, IgM, IgG, IgA, sIgA.

Адрес для переписки:

Мальцева Нина Васильевна
654005, Россия, Кемеровская обл., г. Новокузнецк,
пр. Строителей, 5, НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России.
Тел.: 8 (384) 345-56-41. Факс: 8 (384) 345-42-19.
E-mail: ninamaltseva2015@mail.ru

Contacts:

Nina V. Maltseva
654005, Russian Federation, Kemerovo Region, Novokuznetsk,
Stroitelei pr., 5, Novokuznetsk State Institute for Further Training
of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH.
Phone: +7 (384) 345-56-41. Fax: +7 (384) 345-42-19.
E-mail: ninamaltseva2015@mail.ru

Для цитирования:

Мальцева Н.В., Викторова И.Б., Казанцева О.М., Архипова С.В., Ханин А.Л. Иммуноглобулины и предикция летальности при клиническом течении коинфекции ВИЧ и туберкулеза // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 539–548. doi: 10.15789/2220-7619-IAP-1366

Citation:

Maltseva N.V., Viktorova I.B., Kazantseva O.M., Arkhipova S.V., Khanin A.L. Immunoglobulins and predicted mortality in clinical course of concomitant HIV and TB infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 539–548. doi: 10.15789/2220-7619-IAP-1366

IMMUNOGLOBULINS AND PREDICTED MORTALITY IN CLINICAL COURSE OF CONCOMITANT HIV AND TB INFECTION

Maltseva N.V., Viktorova I.B., Kazantseva O.M., Arkhipova S.V., Khanin A.L.

Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Novokuznetsk, Russian Federation

Abstract. A search for prognostic markers of HIV and tuberculosis coinfection (HIV/TB), especially in case of *Mycobacterium tuberculosis* multidrug resistance (MDR MBT) associated with low rates of TB eradication, is of relevance in connection with the problem of choosing adequate anti-TB therapy which is able to decrease mortality. 113 HIV/TB patients aged 24 to 58 years were examined: 70 males and 43 females hospitalized at the Novokuznetsk TB Clinic during the 2017–2019 period. MDR MBT (concomitant resistance to Isoniazid and Rifampicin) was found in 50 patients (12 patients with MDR MBT had additional resistance to Fluoroquinolones) aged 24 to 54 years — 31 males and 19 females. The control group consisted of 49 healthy individuals aged 27 to 72 years (26 females and 23 males) lacking focal and systemic infections with moderately pronounced age-related changes. In plasma samples, concentration of total (non-specific) immunoglobulins of classes E, M, G, A (including secretory immunoglobulin A, sIgA) were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay. Data statistical processing was performed by using licensed software packages InStatII, Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 22. An extended range of individual variability in count of peripheral blood CD4 lymphocytes was revealed both among non-survivor and survivor patients with HIV/TB examined, being a drawback of using such parameter as lethality predictor. It was found that the serum level of total IgE, IgM, IgG, IgA and sIgA in patients with HIV/TB was higher than that one in control group, whereas in non-survivor vs. survivor patients the concentration of IgE and sIgA was elevated. The coefficient of disease outcome prediction (CP) for patients with HIV/TB and MDR MBT was calculated being equal to the ratio of the multiplication of serum concentration of IgE, IgM, IgA and secretory IgA to CD4 lymphocyte count ($CP = IgE \times IgM \times IgA \times sIgA/CD4$). CP higher than 200 was detected in 77% non-survivor and 6% of survivor patients. The relative risk of death with $CP > 200$ was very high ($OR = 56.7, p < 0.0001$) being 8.5 times higher than that one upon $CD4 < 200$ ($OR = 6.7, p = 0.0237$). A positive correlation between CP and lethal outcome was more valuable than that of CD4. The data presented allow us to propose CP for clinical use as an effective prognostic criterion for HIV/TB with MDR MBT.

Key words: HIV/tuberculosis coinfection, prediction, outcome of the disease, mortality, IgE, IgM, IgG, IgA, sIgA.

ВИЧ-инфекция остается одной из основных проблем глобального общественного здравоохранения: на сегодняшний день она унесла более 35,4 млн жизней. В 2017 г. около миллиона людей в мире умерли от последствий ВИЧ-инфекции. Напряженность эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции проявляется и в увеличении числа инфицированных ВИЧ, и в росте летальности среди больных ВИЧ-инфекцией. Прогрессия ВИЧ-ассоциированного иммунодефицита наиболее часто приводит к развитию туберкулеза (ТБ), занимающего в России лидирующую позицию (в 50% случаев) среди причин смерти больных ВИЧ-инфекцией. Известно, что при туберкулезе у больных ВИЧ-инфекцией (коинфекция ВИЧ/ТБ) часто выявляется множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* (МЛУ МБТ), наличие которой ассоциировано с низкими показателями излечения ТБ и более высокими показателями летальности в сравнении с пациентами с сохраненной лекарственной чувствительностью *Mycobacterium tuberculosis*.

Поиск прогностических маркеров ВИЧ/ТБ и особенно при МЛУ МБТ является актуальным в связи с проблемой выбора адекватных противотуберкулезных мер, способных снизить уровень летальности. Некоторые из пред-

ложенных предикторов, связанные с успешными результатами лечения, включают высокий индекс массы тела, использование более четырех эффективных препаратов, отрицательный исходный результат микроскопии мазка мокроты, использование фторхинолонов или линезолида в схеме лечения резистентного туберкулеза, проведение хирургической резекции и применение персонализированного лечения [12, 14, 16]. К предикторам неблагоприятного прогноза и неудовлетворительных результатов лечения, кроме МЛУ МБТ [20, 24], относят низкий индекс массы тела [11], наличие множественных локализаций туберкулеза и выраженную иммуносупрессию [5, 6, 9, 18]. Низкий иммунный статус, определяемый по количеству CD4-лимфоцитов в крови, и неподдавленная вирусная нагрузка (ВН), в том числе на фоне антиретровирусной терапии (АРТ), считаются основными предикторами летального исхода при коинфекции ВИЧ/ТБ [15, 19, 23, 26, 27]. Однако среди умерших пациентов нередко встречаются лица, относящиеся к группе с плохо прогнозируемым летальным исходом, т. е. у них не наблюдается выраженной иммуносупрессии и отмечается снижение вирусной нагрузки при адекватной АРТ. С другой стороны, нередко среди долгоживущих обнаруживаются

лица с выраженным иммунодефицитом, у которых количество CD4-лимфоцитов меньше 100 клеток в 1 мкл крови. Проблема предикции неблагоприятных исходов в этой категории пациентов, особенно при МЛУ МБТ, является крайне важной и требует выявления дополнительных прогностических факторов/маркеров ВИЧ/ТБ, использование которых позволит оптимизировать лечебно-диагностическую тактику и программу диспансерного наблюдения больных.

Более двух десятилетий назад установлено, что развитие ВИЧ-инфекции сопровождается существенным повышением уровня сывороточного IgE, которое ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания (переход в СПИД, смерть) [10]. Несмотря на давность установленного факта и выдвинутые гипотезы о механизме развития ВИЧ-инфекции по типу аллергических заболеваний [4], за прошедший временной срок проведено небольшое количество исследований Th2-звена иммунитета, ответственного за синтез антител, в том числе IgE-класса, у ВИЧ-инфицированных больных. Повышенный уровень сывороточного IgE при коинфекции ВИЧ/ТБ некоторые исследователи связывают с асимптоматическим инфицированием гельминтами [3]. Однако антитела IgE, как общие, так и антиген-специфические, определены в повышенной концентрации в крови не только при атопических и паразитарных заболеваниях, но и при бактериальных и вирусных инфекциях, и уже давно не подвергается сомнению участие IgE в иммунном ответе на инфицирование патогенами различного происхождения.

Цель работы — исследование эффективности показателей гуморального иммунитета в качестве предикторов летального исхода у пациентов с коинфекцией ВИЧ и туберкулеза, получающих противотуберкулезную терапию.

Материалы и методы

В исследование включены 113 больных коинфекцией ВИЧ и туберкулеза (ВИЧ/ТБ) в возрасте от 24 до 58 ($36,9 \pm 0,6$) лет: 70 мужчин (62%) в возрасте от 27 до 49 ($36,7 \pm 0,7$) лет и 43 женщины (38%) в возрасте от 24 до 58 ($37,1 \pm 1,2$) лет, находившиеся на стационарном лечении в Новокузнецком клиническом противотуберкулезном диспансере в период с 2017 по 2019 г.

МЛУ МБТ (резистентность одновременно к изониазиду и рифампицину) обнаружена у 50 пациентов (у 12 больных с МЛУ МБТ имелась дополнительная резистентность к фторхинолонам) в возрасте от 24 до 54 ($36,08 \pm 0,94$) лет, мужчин — 31 (62%), женщин — 19 (38%). Работающих было 14 (28%) человек, не работали

34 (68%) человека, инвалидами являлись 2 человека (4%). Злоупотребляли алкоголем 18 (36%) пациентов, 34 (68%) человека указали на инъекционное употребление психоактивных веществ в течение 2–23 лет. МЛУ МБТ была установлена методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах и/или выявлением мутации в гене *rpoB*, ответственной за резистентность к рифампицину (маркер МЛУ) методом Xpert MTB/RIF.

Дополнительными критериями включения в исследование были имеющиеся сведения о количестве CD4-лимфоцитов в 1 мкл крови (исследование проводилось в Новокузнецком центре СПИД), проведение противотуберкулезной терапии согласно действующим федеральным клиническим рекомендациям (больные с МЛУ МБТ получали терапию по IV режиму, а при дополнительной устойчивости к фторхинолонам — по V режиму лечения ТБ) [2], согласие пациентов на участие в исследовании.

Гельминтозы не были диагностированы ни у одного больного по результатам рутинного обследования пациентов в противотуберкулезном учреждении (анализ кала на яйца глистов).

Вирусная нагрузка (ВН, количество копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы крови) определена методом ПЦР у 33 из 50 больных с МЛУ МБТ (66,0%) в Новокузнецком филиале «Кузбасского центра по профилактике и борьбе со СПИД».

Смертельные исходы за период с 2018 по начало 2019 г. зарегистрированы у 28 из 113 (25%) больных в возрасте от 27 до 54 лет ($35,9 \pm 1,1$ лет). Из них мужчин — 17 (61%), женщин — 11 (39%). По результатам аутопсии у большинства больных (более 90%) причиной смерти стало прогрессирование туберкулеза с полиорганным поражением. Сроки жизни больных с момента утверждения диагноза ТБ и взятия на диспансерный фтизиатрический учет до летального исхода составили от 38 до 1500 дней. У 14 (50%) из умерших пациентов имела место коинфекция ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ. Сроки жизни больных ВИЧ/ТБ с МЛУ/МБТ с момента утверждения диагноза ТБ и взятия на диспансерный фтизиатрический учет до летального исхода составили от 38 до 570 дней.

В группу контроля включено 49 практически здоровых лиц в возрасте от 27 до 72 лет (женщин — 26, мужчины — 23), не имеющих признаков очаговой и системной инфекции с умеренно выраженными возрастными изменениями (у лиц старше 60 лет).

Для выделения образцов плазмы у каждого больного забирали по 3 мл цельной венозной крови из локтевой вены в стандартные пробирки, содержащие ЭДТА-К3 (Guangzhou Improve Medical Instruments, Китай). В момент взятия крови на исследование пациенты нахо-

дились в интенсивной фазе лечения туберкулеза. Выделение плазмы проводили стандартно после осаждения клеток центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут.

В образцах плазмы крови определяли концентрацию неспецифических (общих) иммуноглобулинов E (IgE), M (IgM), G (IgG), A (IgA) и секреторного A (sIgA) с использованием стандартных наборов реагентов IgE общий-ИФА-БЕСТ-8660 (Вектор-Бест, Новосибирск), IgM общий-ИФА-БЕСТ-8664 (Вектор-Бест, Новосибирск), IgG общий-ИФА-БЕСТ-8662 (Вектор-Бест, Новосибирск), IgA общий-ИФА-БЕСТ-8666 (Вектор-Бест, Новосибирск) и IgA секреторный-ИФА-БЕСТ (набор реагентов А-8668, Вектор-Бест, Новосибирск) методом твердофазного иммуноферментного анализа на иммуноферментном автоматическом анализаторе «Лазурит» (Dunex Technologies, США).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программ Microsoft Excel версия 14.4.6 (141106), Statistica 6.0, InStatII, IBM SPSS Statistics 22. Стандартная обработка включала подсчет выборки (n — количество обследованных лиц), средних арифметических величин (M), ошибки средней (m), медианы (Me). Также учитывался диапазон разброса данных от минимального до максимального значения ($Min-Max$) в каждой исследуемой выборке. Значимость различий показателей между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (P). Относительный риск по конкретному признаку вычисляли как соотношение шансов ($OR = odds\ ratio$). Корреляционную связь (согласованное изменение двух признаков) между показателями оценивали с помощью

непараметрического критерия Спирмена (r). Влияние одного показателя на степень изменчивости другого оценивали по коэффициенту детерминации в % ($R = r^2 \times 100$). Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

CD4 как прогностический критерий клинического течения коинфекции ВИЧ/ТБ. Сведения о количестве CD4-лимфоцитов имелись для всех обследованных больных. Выявлен большой интервал индивидуальной вариабельности количества CD4-лимфоцитов как среди умерших, так и среди живущих обследованных пациентов (табл. 1). В группе умерших больных с ВИЧ/ТБ диапазон значений количества CD4-лимфоцитов в 1 мкл крови варьировал от 40 до 852 ($M \pm m = 164,5 \pm 34,7$; $Me = 112,0$; $n = 28$), а в группе живущих — от 3 до 1624 ($M \pm m = 274,1 \pm 30,3$; $Me = 178,0$; $n = 85$), в среднем достоверно отличаясь между этими когортами ($P = 0,023$), что было обусловлено различным распределением в них пациентов с отличающимся иммунным статусом. У больных с МЛУ МБТ диапазон значений количества CD4-лимфоцитов в 1 мкл крови также сильно варьировал: у умерших от 50 до 683 ($M \pm m = 159,7 \pm 43,7$; $Me = 112,0$; $n = 14$), а у живущих — от 26 до 1624 ($M \pm m = 359,5 \pm 58,4$; $Me = 233,5$; $n = 36$), в среднем достоверно различаясь между этими когортами ($P = 0,0081$). В табл. 1 показано, что пациентов с числом CD4-лимфоцитов ≤ 200 /мкл среди умерших лиц относительно больше, чем среди живущих. Тем не менее как среди умерших, так и среди живущих обнаружены лица и с низкими, и с высо-

Таблица 1. Количество обследованных больных ВИЧ/ТБ с показателем CD4 (клеток/мкл крови) в различных интервалах при разном исходе заболевания

Table 1. The number of the examined HIV/TB patients with CD4 (cells/ μ l of blood) at various time points and with various disease outcomes

CD4	Количество обследованных больных ВИЧ/ТБ с разным исходом заболевания The number of the examined HIV/TB patients with different outcomes	
	Умершие больные Non-survivor patients	Живущие больные Survivor patients
	Все обследованные больные ВИЧ/ТБ All the examined HIV/TB patients	
	n = 35	
CD4 \leq 100	14 (40%), $P_2 > 0,05$	21 (27%)
100 < CD4 \leq 200	15 (43%), $P_2 > 0,05$	20 (26%)
CD4 > 200	6 (17%), $P_2 = 0,030$	37 (47%)
	Обследованные больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ The examined HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	n = 14 (28%)	
CD4 \leq 100	6 (43%), $P_2 > 0,05$	6 (17%)
100 < CD4 \leq 200	6 (43%), $P_2 > 0,05$	11 (31%)
CD4 > 200	2 (14%), $P_2 = 0,0237$	19 (53%)

кими значениями количества CD4-лимфоцитов как во всей выборке обследованных больных ВИЧ/ТБ, так и среди больных с МЛУ МБТ. Выраженная вариабельность показателя CD4 в обеих когортах умерших и живущих пациентов обусловила низкий коэффициент детерминации и слабую по выраженности отрицательную корреляционную связь между количеством CD4-лимфоцитов и летальным исходом во всей выборке ($R = 5\%$, $r = -0,2156$, $P = 0,0219$, $n = 113$). В когорте пациентов с ВИЧ/ТБ и МЛУ МБТ корреляционная связь CD4 с летальным исходом была сильнее ($R = 14\%$, $r = -0,3797$, $P = 0,0065$, $n = 50$). ВН, определенная у 31 больного с МЛУ МБТ (62%), также широко варьировала в диапазоне от 500 до 4 708 296 копий/мл ($M = 656\ 042$ копии/мл, $Me = 471\ 408$ копий/мл). Подавленная ВН (< 500 копий/мл) обнаружена только у 2 из 33 обследованных больных (6,1%). Вариабельность обоих показателей (количества CD4-лимфоцитов и ВН) обусловила низкий коэффициент детерминации ($R = 13\%$, $P = 0,043$, $n = 33$) между ними, означающий слабое влияние ВН на показатель CD4-лимфоцитов, и среднюю отрицательную корреляционную связь ($r = -0,355$, $P = 0,043$, $n = 33$).

Таким образом, большая индивидуальная вариабельность показателя количества CD4-лимфоцитов как у умерших, так и у живущих обследованных нами пациентов с ВИЧ/ТБ является недостатком использования показателя количества CD4-лимфоцитов для предикции летальности.

Исследование общих (неспецифических) IgE, IgM, IgG, IgA и sIgA как прогностических марке-

ров клинического течения коинфекции ВИЧ/ТБ. Содержание общих IgE, IgM, IgG, IgA и sIgA в плазме крови больных коинфекцией ВИЧ/ТБ было выше в сравнении с данными показателями у практически здоровых людей (табл. 2). Наиболее сильно был увеличен уровень IgE: в среднем в 8,7 раза в выборке всех больных ВИЧ/ТБ и в 6,7 раза в когорте больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ. Вторым по значимости был прирост уровня sIgA: в 4 и 3,5 раза соответственно. Прирост количества остальных иммуноглобулинов был меньше: в 1,5–2 раза в сравнении с контролем. Гендерных различий не выявлено.

Содержание исследованных иммуноглобулинов у умерших больных в сравнении с живущими показано в табл. 3. Выявлено повышенное количество иммуноглобулинов двух классов — IgE и IgA — у умерших в сравнении с живущими, и поэтому данные показатели могут быть связаны с летальным исходом. Наиболее выраженный прирост концентрации IgE и sIgA наблюдался у больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ — в 2 и 1,4 раза, в то время как во всей выборке больных ВИЧ/ТБ — в 1,6 и 1,3 раза соответственно.

Корреляционная связь исследованных иммунных показателей с количеством CD4-лимфоцитов и с летальным исходом. Коэффициент предикции летальности среди больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ. Результаты, представленные в табл. 4, показывают, что концентрация в плазме крови IgE коррелирует с CD4 и летальным исходом как во всей выборке больных ВИЧ/ТБ, так и в когорте больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ. Среди других иммуноглобулинов наиболее высокая корреляция связывает sIgA с летальным исхо-

Таблица 2. Содержание общих IgE (ме/мл), IgM (мг/мл), IgG (мг/мл), IgA (мг/мл) и sIgA (мг/л) в плазме крови обследованных больных ВИЧ/ТБ

Table 2. Total serum IgE (IU/ml), IgM (mg/ml), IgG (mg/ml), IgA (mg/ml) and sIgA (mg/l) level in HIV/TB patients examined

Обследованные больные The examined patients	IgE	IgM	IgG	IgA	sIgA
Все обследованные больные ВИЧ/ТБ All the examined HIV/TB patients	375,8±34,9* (110) 215,8** [0,54–1228,09]*** P _{контроль} < 0,0001	3,1±0,2 (67) 3,2 [0,6–5,7] P _{контроль} < 0,0001	23,8±0,5 (110) 24,6 [9,94–35,1] P _{контроль} < 0,0001	3,7±0,2 (66) 3,7 [1,0–7,4] P _{контроль} = 0,004	13,4±0,7 (110) 11,1 [0,0–32,3] P _{контроль} < 0,0001
Обследованные больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ The examined HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	287,8±43,6 (49) 153,2 [11,8–1072,5] P _{контроль} < 0,0001	3,0±0,2 (31) 3,5 [0,6–5,7] P _{контроль} < 0,0001	23,0±0,9 (49) 24,6 [10,9–33,0] P _{контроль} < 0,0001	3,3±0,3 (31) 3,5 [1,2–6,0] P _{контроль} = 0,0742	11,2±1,0 (49) 8,2 [2,0–26,7] P _{контроль} < 0,0001
Контроль The control	43,1±7,4 (49) 20,9 [0,1–186,8]	1,4±0,1 (35) 1,2 [0,3–3,4]	11,2±0,6 (35) 10,1 [7,0–24,1]	2,6±0,2 (35) 2,1 [1,0–5,8]	3,2±0,3 (49) 2,6 [0,9–13,2]

Примечание. В этой и последующих таблицах результаты представлены построчно как $M \pm m$ (*); в круглых скобках количество образцов плазмы крови, Me (**) — медиана, [Min–Max] (***) — разброс данных от минимального до максимального значения; P — критерий Манна–Уитни, цифровое/буквенное обозначение рядом с P указывает на сравниваемую группу.

Note. The data presented line-by-line are shown as $M \pm m$ (*); number of plasma samples are shown in parentheses, Me — mediana (**), [Min–Max] — data ranging from minimal to maximal values (***); P, Mann–Whitney test, numerical/ letter-designation is shown nearby to P points at comparison group.

Таблица 3. Содержание общих IgE (МЕ/мл), IgM (мг/мл), IgG (мг/мл), IgA (мг/мл), sIgA (мг/л) в плазме крови обследованных пациентов с ВИЧ/ТБ при разном исходе заболевания

Table 3. Serum total IgE (IU/ml), IgM (mg/ml), IgG (mg/ml), IgA (mg/ml), sIgA (mg/l) level in HIV/TB patients examined regarding disease outcome

Обследованные лица The examined patients	IgE	IgM	IgG	IgA	sIgA
Все обследованные больные ВИЧ/ТБ All the examined HIV/TB patients					
Умершие больные Non-survivor patients	529,4±69,2 (26) 440,0 [61,1–1135,51] P _{живущие} = 0,003	3,4±0,3 (25) 3,4 [0,6–5,5] P _{живущие} > 0,05	24,7±0,9 (26) 24,6 [14,7–33,0] P _{живущие} > 0,05	4,2±0,3 (25) 4,1 [2,1–7,4] P _{живущие} = 0,020	16,0±1,3 (26) 17,5 [6,3–25,3] P _{живущие} = 0,027
Живущие больные Survivor patients	328,3±39,1 (84) 153,7 [0,5–1228,1]	2,9±0,2 (42) 2,7 [0,9–5,7]	23,5±0,6 (84) 24,6 [9,9–35,1]	3,2±0,3 (42) 3,3 [0,0–7,2]	12,6±0,8 (84) 9,7 [0,0–32,3]
Обследованные больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ The examined HIV/TB patients with multidrug resistance <i>Mycobacterium tuberculosis</i>					
Умершие больные Non-survivor patients	454,1±91,8 (14) 395,6 [65,1–072,5] P _{живущие} = 0,0067	3,3±0,4 (13) 3,4 [0,6–5,4] P _{живущие} > 0,05	23,6±1,4 (14) 24,8 [12,8–32,5] P _{живущие} > 0,05	3,7±0,2 (13) 3,9 [2,3–4,7] P _{живущие} > 0,05	14,2±1,6 (14) 14,8 [6,3–22,6] P _{живущие} = 0,0247
Живущие больные Survivor patients	221,2±45,0 (35) 126,0 [11,8–1020,8]	2,8±0,3 (18) 2,7 [0,9–5,7]	22,7±1,2 (35) 24,4 [10,9–33,0]	3,0±0,4 (18) 2,1 [1,2–6,0]	10,0±1,1 (35) 7,6 [2,0–26,7]

дом в когорте больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ. Был предпринят анализ корреляционной связи между разными коэффициентами, рассчитанными на их основе, и летальным исходом у пациентов при ВИЧ/ТБ и ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ (табл. 5). Наиболее сильная корреляционная связь с летальным исходом обнаружена при ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ для коэффициента, в который были включены показатели четырех иммуноглобулинов — IgE, IgM, IgA и sIgA. И в качестве коэффициента предикции летального исхода (КП) у больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ нами выбран коэффициент, равный отноше-

нию произведения концентраций IgE, IgM, IgA и секреторного IgA в плазме крови к количеству CD4-лимфоцитов ($KП = \frac{IgE \times IgM \times IgA \times sIgA}{CD4}$). КП более 200 был выявлен у 77% умерших и 6% живущих пациентов, т. е. количество умерших больных с КП > 200 превысило количество живущих с КП > 200 в 12,8 раза. КП положительно и сильно коррелировал с летальным исходом ($R = 50\%$, $r = 0,7090$, $P < 0,0001$, $n = 31$) и средне — с вирусной нагрузкой ($R = 21\%$, $r = 0,462$, $p = 0,046$, $n = 19$). Относительный риск летального исхода при КП > 200 оказался очень высоким ($OR = 56,7$, $P < 0,0001$).

Таблица 4. Корреляционная связь между иммуноглобулинами и количеством CD4-лимфоцитов и летальным исходом у обследованных пациентов с ВИЧ/ТБ

Table 4. A correlation between immunoglobulin level together with count of CD4 lymphocytes and lethal outcome in HIV/TB patients examined

Параметры Parameters	Все обследованные больные ВИЧ/ТБ All the examined HIV/TB patients	Обследованные больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ The examined HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Все обследованные больные ВИЧ/ТБ All the examined HIV/TB patients	Обследованные больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ The examined HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	CD4		Летальный исход/Lethal outcome	
IgE	R = 16%, r = -0,402, P = 0,000 (110)	R = 12%, r = -0,349, P = 0,014 (49)	R = 8%, r = 0,286, P = 0,002 (110)	R = 15%, r = 0,393, P = 0,0052 (49)
IgG	P > 0,05 (110)	P > 0,05 (49)	P > 0,05 (110)	P > 0,05 (49)
IgM	P > 0,05 (67)	P > 0,05 (31)	P > 0,05 (110)	P > 0,05 (31)
IgA	R = 6%, r = -0,243, P = 0,048 (67)	P > 0,05 (31)	R = 8%, r = 0,286, P = 0,019 (67)	P > 0,05 (31)
sIgA	R = 8%, r = -0,286, P = 0,002 (110)	P > 0,05 (49)	R = 4%, r = 0,212, P = 0,026 (110)	R = 11%, r = 0,326, P = 0,0223 (49)

На основании полученных результатов нами был предложен способ прогнозирования летального исхода при клиническом течении коинфекции ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ, основанный на вычислении КП, при превышении которым значения 200 можно прогнозировать летальный исход с 56,7-кратным относительным риском [1].

Сравнение эффективности показателей CD4 и КП как прогностических критериев клиническо-

го течения ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ. Представленные в табл. 6 полученные нами данные показывают, что при сходном индивидуальном разбросе у умерших и живущих больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ показателей CD4 (50–683 и 26–1624 соответственно) и КП (29–3244 и 1–1078 соответственно) обнаружена достоверная разница между этими когортами, заключающаяся в преобладании низких значений CD4 (< 200,

Таблица 5. Корреляционная связь между иммунными показателями и летальным исходом у больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ

Table 5. A correlation between immune parameters and mortality in HIV/TB patients with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*

Параметры Parameters	Корреляция Correlation	Граничный показатель Boundary indicator	Количество пациентов с граничным показателем The number of patients with a boundary indicator		Отношение числа умерших (в %) к числу живущих (в %) Ratio of non-survivor patients (in %) to survivor patients (in %)
			Умершие больные Non-survivor patients	Живущие больные Survivor patients	
CD4, клеток/мкл cells/ μ l	$r = -0,3797$, $P = 0,0065$, $n = 50$	< 200	12/15* (80%)	17/36** (47%)	1,7
IgE, МЕ/мл IU/ml	$r = 0,3929$, $P = 0,0052$, $n = 49$	> 200	11/14 (79%)	10/35 (29%)	2,7
IgM, мг/мл mg/ml	$P > 0,05$, $n = 31$	> 2	11/13 (85%)	12/18 (67%)	1,3
IgG, мг/мл mg/ml	$P > 0,05$, $n = 49$	> 16	14/17 (82%)	24/32 (75%)	1,1
IgA, мг/мл mg/ml	$P > 0,05$, $n = 31$	> 4	6/13 (46%)	5/18 (28%)	1,6
sIgA, мг/л mg/l	$r = 0,3258$, $P = 0,0223$, $n = 49$	> 5,5	14/14 (100%)	26/35 (74%)	1,4
IgE x IgM	$r = 0,6286$, $P = 0,0002$, $n = 31$	> 500	10/13 (77%)	3/18 (17%)	4,5
IgE x IgA	$r = 0,5116$, $P = 0,0033$, $n = 31$	> 1000	8/13 (62%)	3/18 (17%)	3,6
IgE x sIgA	$r = 0,4376$, $P = 0,0017$, $n = 49$	> 1500	11/14 (79%)	14/35 (40%)	2,0
IgM x IgA	$P > 0,05$, $n = 31$	> 10	8/13 (62%)	5/18 (28%)	2,2
IgM x sIgA	$r = 0,3801$, $P = 0,0349$, $n = 31$	> 30	10/13 (77%)	6/18 (33%)	2,3
sIgA x IgA	$r = 0,4239$, $P = 0,0175$, $n = 31$	> 30	10/13 (77%)	6/18 (33%)	2,3
IgE x IgA x IgM	$r = 0,5628$, $P = 0,0010$, $n = 31$	> 2000	11/13 (85%)	5/18 (28%)	3,0
IgE x sIgA x IgM	$r = 0,6066$, $P = 0,0003$, $n = 31$	> 9000	8/13 (62%)	3/18 (17%)	3,6
IgE x sIgA x IgA	$r = 0,5774$, $P = 0,0007$, $n = 31$	> 10 000	10/13 (77%)	3/18 (17%)	4,5
IgM x sIgA x IgA	$r = 0,4458$, $P = 0,0119$, $n = 31$	> 100	8/13 (62%)	7/18 (39%)	1,6
IgE x sIgA x IgM x IgA	$r = 0,6066$, $P = 0,0003$, $n = 31$	> 15 000	11/13 (85%)	4/18 (22%)	3,8
IgE/CD4 ⁺	$r = 0,4919$, $P = 0,0003$, $n = 49$	> 1,5	9/13 (69%)	6/35 (17%)	4,1
IgM/CD4 ⁺	$r = 0,6359$, $P = 0,0001$, $n = 31$	> 0,02	8/13 (62%)	3/18 (17%)	3,6
IgA/CD4 ⁺	$r = 0,6359$, $P = 0,0001$, $n = 31$	> 0,02	10/13 (77%)	2/18 (11%)	7,0
sIgA/CD4 ⁺	$r = 0,5015$, $P = 0,0002$, $n = 49$	> 0,1	9/14 (64%)	6/35 (17%)	3,8
IgE x IgM/CD4 ⁺	$r = 0,7309$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 3	11/13 (85%)	2/18 (11%)	7,7
IgE x IgA/CD4 ⁺	$r = 0,6505$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 10	7/13 (54%)	1/18 (6%)	9,0
IgE x sIgA/CD4 ⁺	$r = 0,5175$, $P = 0,0001$, $n = 49$	> 20	10/14 (71%)	5/35 (14%)	5,0
IgM x IgA/CD4 ⁺	$r = 0,6359$, $P = 0,0001$, $n = 31$	> 0,05	9/13 (69%)	3/18 (17%)	4,0
IgM x sIgA/CD4 ⁺	$r = 0,6724$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 0,2	10/13 (77%)	3/18 (17%)	4,5
sIgA x IgA/CD4 ⁺	$r = 0,6359$, $P = 0,0001$, $n = 31$	> 0,2	11/13 (85%)	3/18 (17%)	5,0
IgE x IgA x IgM/CD4 ⁺	$r = 0,7163$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 20	8/13 (62%)	1/18 (6%)	10,3
IgE x sIgA x IgA/CD4 ⁺	$r = 0,6505$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 30	11/13 (85%)	3/18 (17%)	5,0
IgE x sIgA x IgM/CD4 ⁺	$r = 0,7090$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 100	9/13 (69%)	1/18 (6%)	11,5
IgM x sIgA x IgA/CD4 ⁺	$r = 0,6505$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 1,0	8/13 (62%)	2/18 (11%)	5,6
IgE x sIgA x IgM x IgA/CD4 ⁺	$r = 0,7090$, $P < 0,0001$, $n = 31$	> 200	10/13 (77%)	1/18 (6%)	12,8

Примечание. За косой чертой указано *общее количество умерших больных, **общее количество живущих больных.
Note. Behind the slash is *total number of non-survival patients, **total number of survival patients.

Таблица 6. Сравнение CD4 (клеток/мкл крови) и коэффициента предикции (КП) как прогностических критериев коинфекции ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТTable 6. Comparing CD4 (cells/ μ l blood) and prediction coefficient (CP) as prognostic criterion for HIV/TB and MDR MBT coinfection

Параметры Parameters	Исход заболевания Disease outcome	
	Умершие больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ Non-survivor HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Живущие больные ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ Survivor HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	1	2
	(14) 28%	(36) 72%
	[Min–Max]	
CD4	[50–683], $P_2 = 0,002$	[26–1624]
КП/CP	[29–3244], $P_2 = 0,000$	[1–1078]
	Количество обследованных больных ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ The number of the examined HIV/TB patients with multidrug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
CD4 < 200	(12) 86%	(17) 47%
КП/CP > 200	(10) 71%	(1) 3%
	Корреляционная связь с вирусной нагрузкой/Viral load correlation	
CD4	$r = -0,355$, $P = 0,043$ (33)	
КП/CP	$r = 0,462$, $P = 0,046$ (19)	
	Корреляционная связь с летальным исходом/Mortality correlation	
CD4	$r = -0,3797$, $P = 0,0065$ (50)	
КП/CP	$r = 0,7090$, $P < 0,0001$ (31)	
	Прогностический риск (вероятность) летального исхода Predictive risk (probability) of lethal outcome	
CD4 < 200	OR = 6,7, $P = 0,0237$	
КП/CP > 200	OR = 56,7, $P < 0,0001$	

154,2 \pm 36,2 кл/мкл крови, $n = 12$) и высоких значений КП (> 200, 824,8 \pm 252,1, $n = 10$) в когорте умерших пациентов и преимущественности высоких значений CD4 (380,5 \pm 62,4 кл/мкл крови, $n = 19$) и низких — КП (90,9 \pm 58,7, $n = 35$) у живущих больных ($P = 0,00$). Однако CD4 < 200 наблюдался у половины (47%) живущих больных, в то время как КП > 200 — только у 1 (3%) человека. Корреляционная связь КП с летальным исходом более сильная ($r = 0,7090$, $P < 0,0001$, $n = 31$), чем у показателя CD4 ($r = -0,3797$, $P = 0,0065$, $n = 50$). Относительный риск летального исхода при КП > 200 оказался очень высоким (OR = 56,7, $P < 0,0001$) и был в 8,5 раза выше, чем при CD4 < 200 (OR = 6,7, $P = 0,0237$). Представленные результаты позволяют предложить КП в качестве более эффективного для клинического использования прогностического критерия в сравнении с показателем CD4 для ВИЧ/ТБ-коинфицированных больных с МЛУ МБТ.

Обсуждение

Давно известно, что повышенные уровни сывороточных общего IgE и Th2-цитокинов ассоциируются с плохим прогнозом заболевания у ВИЧ-инфицированных больных [10]. Рост концентрации общего IgE на ранних стадиях

ВИЧ-инфекции, отражающий поликлональную активацию В-лимфоцитов [13, 25], предшествует снижению количества CD4-лимфоцитов и может служить чувствительным маркером развития заболевания [8, 17], хотя были обнаружены и специфические к вирусным белкам gp160, p24 и p17 IgE-антитела [21], которые могут противодействовать репликации вируса [22]. Наши данные, показавшие количественный рост общего IgE в плазме крови госпитализированных больных с коинфекцией ВИЧ/ТБ и положительную корреляционную связь его концентрации с летальным исходом, совпадают с литературными.

ВИЧ-инфицирование запускает продукцию IL-4, который преимущественно индуцирует синтез IgE, но не IgA-, IgG- и IgM-антител [7]. Однако сообщалось, что уровень IgA, IgG и IgM также повышается у больных людей [17]. В настоящем исследовании выявлено увеличение плазменных уровней IgM-, IgG-, IgA-классов у пациентов с ВИЧ/ТБ. Однако связи концентраций общих IgM, IgG и IgA с летальным исходом не было обнаружено. Нами впервые установлено, что у умерших больных в сравнении с живущими при ВИЧ/ТБ растет содержание секреторного IgA, которое положительно коррелирует с летальным исходом. На основании

выполненного анализа уровня иммуноглобулинов различных классов в плазме крови обследованных лиц мы установили КП исхода заболевания для пациентов с ВИЧ/ТБ и МЛУ МБТ, коррелирующий с летальным исходом и вирусной нагрузкой более сильно, чем общепринятый показатель CD4. КП позволяет выявлять больных коинфекцией ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ, получающих противотуберкулезную терапию, с прогностическим риском летального исхода при КП > 200 в 12,6 раза выше, чем при CD4 < 200 [1].

Заключение

Предложен новый способ прогнозирования и КП летального исхода при клиническом течении коинфекции ВИЧ и туберкулеза с выявленной множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*. Представленные результаты позволяют предложить КП в качестве эффективного прогностического критерия для клинического использования при ВИЧ/ТБ с МЛУ МБТ.

Список литературы/References

1. Патент № 2710266 Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01). Способ прогнозирования летального исхода при клиническом течении коинфекции ВИЧ и туберкулез, сопровождающимся множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*: № 2019130688; заявлено 2019.09.26: опубликовано 2019.12.25 / Мальцева Н.В., Викторова И.Б., Казанцева О.М., Архипова С.В., Ханин А.Л. Патентообладатель: ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. 16 с. [Patent No. 2710266 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01). A method for predicting fatal outcome in the clinical course of a coinfection of HIV and tuberculosis, accompanied by multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: No. 2019130688; application: 2019.09.26; date of publication 2019.12.25 / Maltseva N.V., Viktorova I.B., Kazantseva O.M., Arkhipova S.V., Khanin A.L. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie dopolnitelnogo professionalnogo obrazovaniya "Rossijskaya meditsinskaya akademiya nepreryvnogo professionalnogo obrazovaniya" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBOU DPO RMANPO Minzdrava Rossii) (GU NIIVS im. I.I. Mechnikova). 16 p.]
2. Российское общество фтизиатров. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией, 2016 г. М.: РОФ, 2016. [Russian Association of Phthisiatrists. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis in patients with HIV infection, 2016. Moscow: RAPH, 2016]. URL: http://roftb.ru/netcat_files/doks2016/rec2016.pdf (11.11.2020)
3. Abate E., Belayneh M., Gelaw A., Idh J., Getachew A., Alemu S., Diro E., Fikre N., Britton S., Elias D., Aseffa A., Stendahl O., Schön T. The Impact of asymptomatic helminth co-infection in patients with newly diagnosed tuberculosis in North-West Ethiopia. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8: e42901. doi: 10.1371/journal.pone.0042901
4. Becker Y. The changes in the T helper 1 (th1) and T helper 2 (th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers — a review and hypothesis. *Virus Genes*, 2004, vol. 28, no. 1, pp. 5–18. doi: 10.1023/b:viru.0000012260.32578.72
5. Bei C., Fu M., Zhang Y., Xie H., Yin K., Liu Y., Zhang L., Xie B., Li F., Huang H., Liu Y., Yang L., Zhou J. Mortality and associated factors of patients with extensive drug-resistant tuberculosis: an emerging public health crisis in China. *BMC Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 1: 261. doi: 10.1186/s12879-018-3169
6. Brust J.C.M., Shah N.S., Mlisana K., Moodley P., Allana S., Campbell A., Johnson B.A., Master I., Mthiyane T., Lachman S., Larkan L.M., Ning Y., Malik A., Smith J.P., Gandhi N.R. Improved Survival and cure rates with concurrent treatment for multidrug-resistant Tuberculosis-Human immunodeficiency virus coinfection in South Africa. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, vol. 66, no. 8, pp. 1246–1253. doi: 10.1093/cid/cix1125
7. Dugas N., Dereuddre-Bosquet N., Goujard C., Dormont D., Tardieu M., Delfraissy J.F. Role of nitric oxide in the promoting effect of HIV type 1 infection and of gp120 envelop glycoprotein on interleukin 4-induced IgE production by normal human mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2000, vol. 16, pp. 251–258. doi: 10.1089/088922200309340
8. Ferrazzi M., De Rinaldis M.L., Salotti A., Cirelli A. Serum IgE levels in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infected patients: correlation between IgE and CD4⁺ cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 1993, vol. 15, no. 2, pp. 67–70.
9. Gandhi N.R., Andrews J.R., Brust J.C., Montreuil R., Weissman D., Heo M., Moll A.P., Friedland G.H., Shah N.S. Risk factors for mortality among MDR- and XDR-TB patients in a high HIV prevalence setting. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2012, vol. 16, no. 1, pp. 90–97. doi: 10.5588/ijtld.11.0153
10. Israel-biet D., Labrousse F., Tourani J.-M., Sors H., Andrieu J.-M., Even P. Elevation of IgE in HIV-infected subjects: a marker of poor prognosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, vol. 89, no. 1, pp. 68–75. doi: 10.1016/s0091-6749(05)80042-9
11. Khan M.A., Mehreen S., Basit A., Khan R.A., Javaid A. Predictors of poor outcomes among patients treated for multidrug-resistant tuberculosis at tertiary care hospital in Pakistan. *Am.-Euras. J. Toxicol. Sci.*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 162–172. doi: 10.1155/2019/3569018
12. Kibret K.T., Moges Y., Memiah P., Biadgilign S. Treatment outcomes for multidrug-resistant tuberculosis under DOTS-Plus: a systematic review and meta-analysis of published studies. *Infect. Dis. Poverty*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 7. doi: 10.1186/s40249-016-0214-x
13. Koutsonikolis A., Nelson R.P., Fernandez-Caldas E., Brigino E.N., Seleznick M., Good R.A., Lockey R.F. Serum total and specific IgE levels in children infected with human immunodeficiency virus. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, no. 97, pp. 692–697. doi: 10.1016/s0091-6749
14. Kwak N., Kim H., Yoo C., Kim Y.W., Han S.K., Yim J. Changes in treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2015, vol. 19, no. 5, pp. 525–530. doi: 10.5588/ijtld.14.0739
15. Kwan C.K., Ernst J.D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 351–376. doi: 10.1128/CMR.00042-10

16. Kwon Y., Kim Y., Suh G., Chung M., Kim H., Kwon O., Choi Y., Kim K., Kim J., Shim Y., Koh W. Treatment outcomes for HIV-uninfected patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 47, no. 4, pp. 496–502. doi: 10.1086/590005
17. Miguez-Burbano M.J., Shor-Posner G., Fletcher M.A., Lu Y., Moreno J.N., Carcamo C., Page B., Quesada J., Sauberlich H., Baum M.K. Immunoglobulin E levels in relationship to HIV-1 disease, route of infection, and vitamin E status. *Allergy*, 1995, vol. 50, no. 2, pp. 157–161. doi: 10.1111/j.1398-9995.1995.tb05073.x
18. Molle E.W., Chilongola J.O. Predictors for mortality among multidrug-resistant tuberculosis patients in Tanzania. *J. Trop. Med.*, 2017: 9241238. doi: 10.1155/2017/9241238
19. Pathmanathan I., Dokubo E.K., Shiraishi R.W., Agolory S.G., Auld A.F., Onotu D., Odafe S., Dalhatu I., Abiri O., Debem H.C., Bashorun A., Ellerbrock T. Incidence and predictors of tuberculosis among HIV-infected adults after initiation of antiretroviral therapy in Nigeria, 2004–2012. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 3: e0173309. doi: 10.1371/journal.pone.0173309
20. Schnippel K., Shearer K., Evans D., Berhanu R., Dlamini S., Ndjeka N. Predictors of mortality and treatment success during treatment for rifampicin-resistant tuberculosis within the South African National TB Programme, 2009 to 2011: a cohort analysis of the national case register. *Int. J. Infect. Dis.*, 2015, no. 39, pp. 89–94. doi: 10.1016/j.ijid.2015.09.002
21. Secord E.A., Kleiner G.I., Auci D.L., Smith-Norowitz T., Chice S., Finkielstein A., Nowakowski M., Fikrig S., Durkin H.G. IgE against HIV proteins in clinically healthy children with HIV disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, no. 98, pp. 979–984. doi: 10.1016/s0091-6749(96)80015-7
22. Seroogy C.M., Wara D.W., Bluth M.H., Dorenbaum A., White C., Durkin H.G., Elder M.E. Cytokine profile of a long-term pediatric HIV survivor with hyper-IgE syndrome and a normal CD4 T-cell count. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, vol. 104, no. 5, pp. 1045–1051. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70087-4
23. Sharma S.K., Soneja M., Prasad K.T., Ranjan S. Clinical profile & predictors of poor outcome of adult HIV-tuberculosis patients in a tertiary care centre in North India. *Indian J. Med. Res.*, 2014, vol. 139, no. 1, pp. 154–160.
24. Tang S., Tan S., Yao L., Li F., Li L., Guo X., Liu Y., Hao X., Li Y., Ding X., Zhang Z., Tong L., Huang J. Risk factors for poor treatment outcomes in patients with MDR-TB and XDR-TB in China: retrospective multi-center investigation. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12, pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0082943
25. Viganò A., Principi N., Crupi L., Onorato J., Vincenzo Z.G., Salvaggio A. Elevation of IgE in HIV-infected children and its correlation with the progression of disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, vol. 95, no. 2, pp. 627–634. doi: 10.1016/s0091-6749(95)70326-8
26. Vijay S., Kumar P., Chauhan L.S., Rao S.V., Vaidyanathan P. Treatment outcome and mortality at one and half year follow-up of HIV infected TB patients under TB control programme in a district of South India. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 7: e21008. doi: 10.1371/journal.pone.0021008
27. Zhang G., Gong Y., Wang Q., Deng L., Zhang S., Liao Q., Yu G., Wang K., Wang J., Ye S., Liu Z. Outcomes and factors associated with survival of patients with HIV/AIDS initiating antiretroviral treatment in Liangshan prefecture, southwest of China: a retrospective cohort study from 2005 to 2013. *Medicine (Baltimore)*, 2016, vol. 95, no. 27: e3969. doi: 10.1097/MD.0000000000003969

Авторы:

Мальцева Н.В., д.б.н., зав. научно-исследовательской лабораторией молекулярной биологии НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Новокузнецк, Россия;
Викторова И.Б., к.м.н., доцент кафедры фтизиопульмонологии НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Новокузнецк, Россия;
Казанцева О.М., младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Новокузнецк, Россия;
Архипова С.В., к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Новокузнецк, Россия;
Ханин А.Л., к.м.н., профессор, зав. кафедрой фтизиопульмонологии НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Новокузнецк, Россия.

Authors:

Maltseva N.V., PhD, MD (Biology), Head of the Research Laboratory of Molecular Biology, Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Novokuznetsk, Russian Federation;
Viktorova I.B., PhD (Medicine), Associate Professor, Phthiisopulmonology Department, Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Novokuznetsk, Russian Federation;
Kazantseva O.M., Junior Researcher, Research Laboratory of Molecular Biology, Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Novokuznetsk, Russian Federation;
Arkhipova S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Research Laboratory of Molecular Biology, Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Novokuznetsk, Russian Federation;
Khanin A.L., PhD (Medicine), Professor, Head of the Department of Phthiisopulmonology, Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians, Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Novokuznetsk, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТИВОМИКРОБНЫЙ, ПРОТИВОПРОТОЗОЙНЫЙ, ПРОТИВОГРИБКОВЫЙ И ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫЙ КОМПОНЕНТЫ, НА СОСТОЯНИЕ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ И ВАГИНИТОМ

О.М. Бокач¹, М.С. Мурашева², М.С. Селькова², К.В. Сторожева³, С.В. Чепанов⁴, С.А. Сельков⁴

¹ ООО «Центр планирования семьи “Медика”», Санкт-Петербург, Россия

² ООО НПП «ИммуноБиоСервис», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Воспалительные заболевания влагалища, связанные с нарушением микрофлоры входят в число самых распространенных гинекологических заболеваний, с которыми в первую очередь приходится сталкиваться врачу-гинекологу в амбулаторной практике. Значительно ухудшая качество жизни пациенток, эти заболевания негативно влияют и на репродуктивную функцию женщины, приводя как к нарушению фертильности, так и к развитию патологии беременности. На сегодняшний день существует множество различных схем лечения и профилактики этих заболеваний, но недостаточная эффективность терапии и наличие частых рецидивов требует новых исследований в данном направлении. Целью проведенного исследования явилась оценка влияния комбинированного препарата Эльжина (Вертекс, Россия), содержащего противомикробный, противопротозойный, противогрибковый и глюкокортикоидный компоненты, на состояние местного иммунитета у женщин с бактериальным вагинозом и неспецифическим вагинитом. Проведено обследование и лечение 24 женщин. Всем женщинам проведен гинекологический осмотр (осмотр в зеркалах и бимануальное гинекологическое исследование), микроскопическое исследование эпителия шейки матки, определение кариопикнотического индекса. Особое внимание было уделено исследованию местных иммунологических факторов, были исследованы цитокины IL-6, IL-10, TNF α в вагинальном секрете до терапии препаратом Эльжина и после терапии. В результате исследования установлено, что после окончания терапии препаратом Эльжина происходит уменьшение клинической симптоматики, нормализация показателей микроскопии отделяемого мочеполювых органов.

Адрес для переписки:

Чепанов Сергей Владимирович
199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3,
ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д.О. Отта.
Тел.: 8 (812) 328-98-50. Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: chepanovsv@gmail.com

Contacts:

Sergey V. Chepanov
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Mendeleevskaya line, 3,
The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
named after D.O. Ott.
Phone: +7 (812) 328-98-50. Fax: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: chepanovsv@gmail.com

Для цитирования:

Бокач О.М., Мурашева М.С., Селькова М.С., Сторожева К.В.,
Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние комбинированного препарата,
содержащего противомикробный, противопротозойный,
противогрибковый и глюкокортикоидный компоненты, на состояние
местного иммунитета у женщин с бактериальным вагинозом
и вагинитом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 549–555.
doi: 10.15789/2220-7619-AIO-1462

Citation:

Bokach O.M., Murasheva M.S., Selkova M.S., Storozheva K.V.,
Chepanov S.V., Selkov S.A. An impact of the combined drug containing
antimicrobial, antiprotozoal, antifungal and glucocorticoid agents on local
immunity in women with bacterial vaginosis and non-specific vaginitis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,
vol. 11, no. 3, pp. 549–555. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-1462

Статья подготовлена в рамках выполнения плановой НИР, ФНИ №АААА-А19-119021290116-1

Применение препарата не приводит к угнетению пролиферации эпителия влагалища, снижает секрецию провоспалительного цитокина TNF α в вагинальном секрете и приводит к смещению баланса в сторону противовоспалительных цитокинов. С точки зрения противовоспалительной терапии это является патогенетическим обоснованием для назначения Эльжины женщинам с бактериальным вагинозом и неспецифическим вагинитом. Многочисленными рандомизированными клиническими исследованиями доказаны высокая эффективность и безопасность двухэтапной терапии воспалительных заболеваний слизистой влагалища, а именно использования антибактериальной терапии с последующим восстановлением микрофлоры. На наш взгляд, эту концепцию следовало бы дополнить и третьим этапом, заключающимся в коррекции местного иммунитета, направленной на нормализацию баланса про- и противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: Эльжина, вагинит, бактериальный вагиноз, цитокины, местный иммунитет, инфекции, орнидазол, неомицин.

AN IMPACT OF THE COMBINED DRUG CONTAINING ANTIMICROBIAL, ANTIPROTOZOAL, ANTIFUNGAL AND GLUCOCORTICOID AGENTS ON LOCAL IMMUNITY IN WOMEN WITH BACTERIAL VAGINOSIS AND NON-SPECIFIC VAGINITIS

Bokach O.M.^a, Murasheva M.S.^b, Selkova M.S.^b, Storozheva K.V.^c, Chepanov S.V.^d, Selkov S.A.^d

^a Center for Family Planning "Medica", St. Petersburg, Russian Federation

^b "ImmunoBio.Service", St. Petersburg, Russian Federation

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

^d The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Inflammatory diseases of the vagina related to imbalanced microflora composition represent one of the most common gynecological diseases primarily dealt with by obstetrician/gynecologists. Such diseases markedly worsen female patient quality of life as well as affect female reproductive system resulting both in altered fertility and adverse pregnancy outcomes. By now, multiple therapeutic and preventive protocols have been proposed to manage such diseases, but insufficient therapeutic efficacy and frequent relapses require further investigations. The aim of the study was to evaluate an effect of the drug Elgyna (Wertex, Russia) consisting of antibacterial, antifungal and glucocorticoid agents on local immunity in females with bacterial vaginosis and nonspecific vaginitis. For this, there were examined and treated 24 females enrolled to the study, who underwent gynecological examination (speculum and bimanual vaginal examination), cervical epithelium microscopy, and calculating karyopycnotic index. Special attention was paid to quantifying level of cytokines IL-6, IL-10, TNF α in vaginal smears before and after therapy with the drug Elgyna. It was found that by the end of the therapy course vaginally administered Elgyna resulted in significantly ameliorated clinical symptoms and normalized microscopic parameters of vaginal discharge. Moreover, this drug consisting of antibacterial, antifungal and glucocorticoid agents did not suppress vaginal epithelium proliferation, but lowered production of pro-inflammatory cytokine TNF α in vaginal smears and shifted toward anti-inflammatory cytokine production. This evidence pathogenetically justifies administration of the drug Elgyna in females with bacterial vaginosis and nonspecific vaginitis as an anti-inflammatory medicine. Efficacy and safety of the two-step therapeutic approach consisting of antibacterial therapy followed by vaginal microbiota recovery for treating inflammatory diseases of vaginal mucosa were confirmed in multiple randomized clinical trials. We envision that such therapeutic concept might be added with a third component implying correction of local vaginal immunity aimed at normalizing the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines.

Key words: Elgyna, vaginitis, bacterial vaginosis, cytokines, local immunity, infections, ornidazole, neomycin.

Введение

Воспалительные заболевания влагалища, связанные с нарушением микрофлоры, — это распространенная группа нозологических форм. Практически любая инфекция влагалища может стать этиологическим фактором воспаления и дисбиоза [7]. В резолюции совета экспертов по итогам заседания на тему «Заболевания, сопровождающиеся патологическими выделениями из половых путей женщин» в рамках 33-го европейского конгресса Международного союза по борьбе с инфекциями, передаваемыми половым путем, было установлено, что данная проблема весьма актуальна и требует повышенного внимания к вопросам диагностики, лечения и профилактики данных заболеваний [8].

Воспаление влагалища — вагинит — может иметь как неспецифическую, так и специфическую этиологию. Как обособленное заболевание рассматривается кандидозный вульвовагинит (КВВ), который в 24–36% случаев вызван грибами рода *Candida* spp. [11]. Бактериальный вагиноз (БВ) не является типичным воспалительным заболеванием, но он также сопровождается продукцией провоспалительных факторов, при этом преобладает микробный дисбаланс. Вагинит и БВ являются частыми причинами неприятных ощущений в наружных половых органах, патологических выделений из влагалища, которые снижают качество жизни женщины и могут приводить к развитию заболеваний мочеполовой системы и нарушению репродуктивной функции [5].

На сегодняшний день существует множество различных схем лечения этих заболеваний, но недостаточная эффективность терапии и наличие частых рецидивов требует новых исследований в данном направлении. Частое использование препаратов, наличие повторных курсов вызывает резистентность микроорганизмов, что вынуждает применять новые схемы лечения, включать в данные схемы препараты различных групп, в том числе влияющие на местный иммунитет [1, 3]. В проведенном нами исследовании было уделено особое внимание местным иммунологическим факторам, так как наиболее значимые патогенетические процессы происходят именно на локальном уровне. Ключевым событием при развитии воспаления в ответ на патоген является выработка комплекса цитокинов, приводящих к активации различных типов клеток, участвующих в поддержании и регуляции воспаления, обеспечивающих элиминацию патогена и формирование противоинфекционной резистентности организма [4].

Целью проведенного исследования явилась оценка влияния препарата Эльжина (Вертекс, Россия) на состояние местного иммунитета у женщин с бактериальным вагинозом и неспецифическим вагинитом (НВГ).

Материалы и методы

В открытом наблюдательном исследовании, которое проводилось в течение 11 месяцев, приняли участие 47 пациенток. С каждой пациенткой было подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения являлись: основной клинический диагноз «бактериальный вагиноз», «вагинит», «кандидозный вульвовагинит»; возраст 18–42 года; исключение половых контактов на весь период лечения; соблюдение правил личной и половой гигиены.

Критерии исключения женщин из исследования: беременность, лактация; индивидуальная непереносимость любого компонента препарата; длительная «беспричинная» гипертермия, воспалительные заболевания женских тазовых органов, вызванные *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, генитальный герпес, сифилис, любые хронические заболевания в стадии декомпенсации, сахарный диабет, онкологические заболевания, аутоиммунные заболевания, туберкулез, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, получение гормональной оральная контрацепции.

По критериям включения в протокол исследования вошли 24 пациентки, получавшие препарат Эльжина (международное непатентованное название (группировочное название) орнидазол+

неомицин+преднизолон+эконазол). Эльжина — это комбинированный препарат с антибактериальным, противогрибковым и противовоспалительным действием для местного применения в гинекологии. Орнидазол — противопротозойное средство с противомикробным действием. Неомицин — антибиотик широкого спектра действия группы аминогликозидов. Эконазол обладает противогрибковым действием в отношении дерматофитов, дрожжевых и дрожжеподобных грибов рода *Candida* и антибактериальным действием по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. Преднизолон оказывает противовоспалительное, противоаллергическое, противозудное и мембраностабилизирующее действие.

Показания к применению препарата Эльжина — бактериальный вагинит, вызванный банальной пиогенной флорой; вульвовагинальные микозы, вызванные грибами рода *Candida*; вагиниты, вызванные смешанной инфекцией.

Женщины, включенные в исследование, наблюдались в течение 6 недель. Всем пациенткам проведен гинекологический осмотр (осмотр в зеркалах и бимануальное гинекологическое исследование), исследование цитокинов IL-6, IL-10, TNF α в вагинальном секрете, микроскопическое исследование эпителия шейки матки, определение кариопикнотического индекса (КПИ). При сборе анамнеза особое внимание уделялось наличию жалоб на дискомфорт, болезненные ощущения, зуд в наружных половых органах, на патологические выделения с неприятным запахом из наружных половых органов. Критериями оценки эффективности терапии служили уменьшение клинической симптоматики, нормализация микроскопической картины вагинального мазка.

Материал для микроскопического исследования отделяемого мочеполювых органов получали из цервикального канала, заднего свода влагалища и уретры с помощью универсального урогенитального зонда производства ООО «Полимерные изделия» (Россия), помещали на предметное стекло, фиксировали 96%-ным этиловым спиртом и окрашивали по Граму. Микроскопия проводилась с использованием микроскопа Olimpus и просмотром более чем 5 полей зрения при 1000-кратном увеличении.

Определение КПИ проводилось методом микроскопии с целью оценки влияния препарата Эльжина на пролиферацию эпителия влагалища. КПИ — это процентное отношение всех отслоившихся зрелых поверхностных клеток с пикнотическими ядрами к клеткам, содержащим везикулярные ядра диаметром более 6 мкм.

Определение концентрации цитокинов (IL-6, IL-10, TNF α) в вагинальном секрете выполнено с помощью наборов флуоресцентных микрочас-

тиц Human IL-6 Flex Set, Human IL-10 Flex Set, Human TNF α Flex Set и набора буферных растворов Human Soluble Protein Master Buffer Kit производства фирмы BD Biosciences методом проточной цитофлуориметрии в формате СВА. Данный метод исследования обладает большей чувствительностью по сравнению с методом иммуноферментного анализа и позволяет проводить определение одновременно нескольких цитокинов в одном образце. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США) в соответствии с протоколом производителя. Содержание цитокинов нормализовано по общему белку, измеренному по методу Бредфорда, и представлено в виде пг/мг белка.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica for Windows (версия 10.0). Нормальность распределения значения в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. При сравнении двух связанных признаков использовался критерий Вилкоксона. При сравнении качественных признаков применяли χ^2 . Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Средний возраст пациенток, вошедших в исследование, составил $32,6 \pm 7,41$ года. Нежелательных (побочных) явлений от приема препарата зарегистрировано не было. Структура жалоб женщин, оцениваемая при первичном обращении, через 7 дней и спустя 5 недель после проведенной терапии представлена в табл. 1.

Анализ данных микроскопического исследования отделяемого мочеполовых органов пред-

ставлен в табл. 2. Отмечалось выраженное уменьшение лейкоцитоза после проведенной терапии.

После первичного гинекологического осмотра в зеркалах и микроскопического исследования отделяемого мочеполовых органов женщинам были поставлены диагнозы «бактериальный вагиноз» ($n = 3$), «неспецифический вагинит» ($n = 7$), «кандидозный вульвовагинит» ($n = 14$).

Основным направлением данного исследования была оценка факторов местного иммунитета, в частности продукции про- и противовоспалительных цитокинов, от баланса которых зависит интенсивность и динамика воспалительного процесса. Для этого в вагинальном секрете определяли содержание IL-6 и TNF α как провоспалительных цитокинов и IL-10 как противовоспалительного цитокина (рис.).

После применения вагинальных таблеток Эльжина в вагинальном секрете произошло уменьшение провоспалительного цитокина TNF α , что свидетельствует о снижении воспалительной реакции, так как данный цитокин является основным мощным медиатором острой фазы воспаления [10]. При оценке соотношения про- и провоспалительных цитокинов в вагинальном секрете было показано увеличение данного соотношения после проведенной терапии, что говорит о смещении баланса в сторону активации противовоспалительных и уменьшении провоспалительных реакций, что обеспечивает завершение воспаления и возврат защитных реакций к нормальному гомеостатическому состоянию.

Уменьшение местной воспалительной реакции, в свою очередь, приводит к уменьшению лейкоцитоза, прекращению патологических выделений из наружных половых органов, снижению секреции вагинальных желез и, как

Таблица 1. Структура жалоб пациенток

Table 1. Characteristics of study group complaints

Жалобы Complaints	Группа исследования/Study group n = 24		
	Первое обращение First visit n = 24	Обращение через 7 дней In 7 days after the end of the therapy n = 23	Обращение через 5 недель In 5 weeks after the end of the therapy n = 22
Нет жалоб No complaints	—	20 (87%)	18 (82%)
Патологические выделения из наружных половых органов Abnormal vaginal discharge	18 (75%)	3 (13%)	1 (5%)
Неприятный запах выделений из наружных половых органов Unpleasant smell of vaginal discharge	6 (25%)	1 (4%)	0 (0%)
Неприятные ощущения в наружных половых органах (зуд, жжение, дискомфорт) Complaints of discomfort, vulval itching and burning	15 (63%)	2 (9%)	4 (18%)
Неприятные ощущения в наружных половых органах при сексуальных контактах до начала терапии Complaints of discomfort during sexual intercourse before the treatment	4 (17%)	1 (4%)	0 (0%)

Таблица 2. Микроскопическое исследование отделяемого мочеполовых органов у обследованных женщин

Table 2. Microscopic examination of vaginal discharge of the study participants

Показатель Variables	Группа исследования/Study group n = 24		
	До лечения Before the treatment n = 24	Обращение через 7 дней In 7 days after the end of the therapy n = 23	Обращение через 5 недель In 5 weeks after the end of the therapy n = 22
Лейкоциты (количество в поле зрения) White blood cells (amount in a field)	0–5	7 (29%)	12 (52%)
	10–20	8 (33%)	10 (43%)
	> 20	14 (58%)	7 (30%)
«Ключевые» клетки/“Clue” cells	3 (12%)	0 (0%)	3 (14%)
Дрожжевые клетки/Yeast cells	14 (58%)	6 (26%)	3 (14%)
Палочковая флора/Bacillary flora	19 (79%)	19 (83%)	17 (77%)
Кокковая флора/Coccobacillary flora	14 (58%)	12 (52%)	7 (32%)

следствие, к уменьшению или исчезновению жалоб на зуд, жжение, дискомфорт в наружных половых органах.

Оценка кариопикнотического индекса проводилась до лечения, через семь дней и пять недель после проведенной терапии. КПИ оценивался в группах женщин в зависимости от установленного диагноза. У женщин с БВ КПИ до лечения составлял 61%, через семь дней после окончания терапии — 53%, через пять недель после окончания лечения — 74%. У женщин с КВВ до начала терапии КПИ составлял 41%, а через семь дней и пять недель после окончания терапии — 54 и 50% соответственно. У женщин с неспецифическим вагинитом КПИ составлял 40% до лечения, 44% через семь дней после окончания лечения и 39% через пять недель после окончания терапии. Данный простой и доступный метод позволил дать ориентировочное представление об отсутствии отрицательного влияния препарата (в частности, одного из его компонентов — преднизолона) на пролиферацию эпителия.

Обсуждение

В проведенном нами исследовании по изучению влияния комбинированного препарата, содержащего орнидазол, неомицин, преднизолон, эконазол, на состояние местного иммунитета у женщин с бактериальным вагинозом и неспецифическим вагинитом была проведена оценка жалоб, клинических симптомов, данных микроскопии отделяемого мочеполовых органов, содержания цитокинов IL-6, IL-10, TNF α в вагинальном секрете, оценка кариопикнотического индекса. Уже через 7 дней после проведенного лечения с использованием вагинальных таблеток Эльжина 87% женщин не предъявляли жалоб при активном опросе. Но через 5 недель после окончания лечения у 18% женщин возобновились жалобы на неприятные ощущения в наружных половых органах, что может быть связано со снижением количества *Lactobacillus* spp., занимающих лидирующие позиции в составе влагалищного микро-

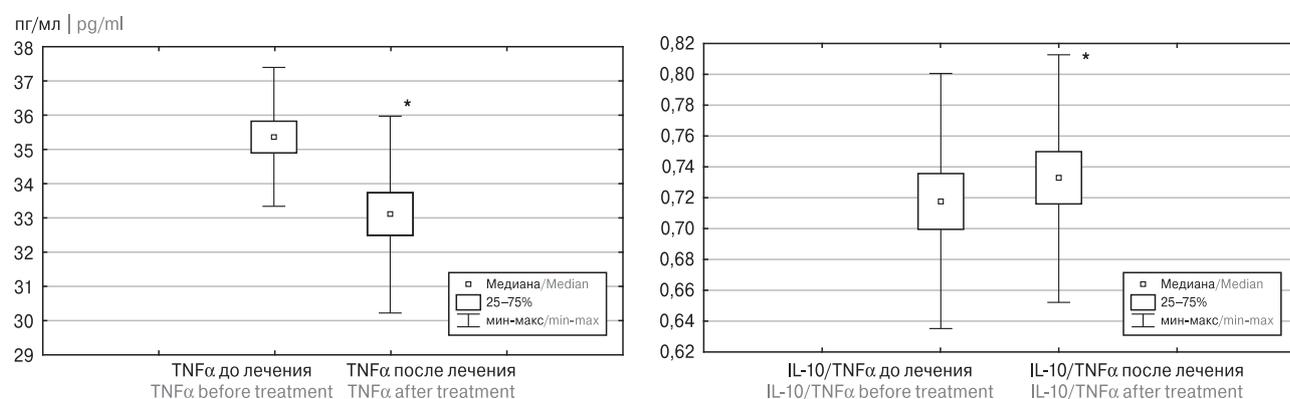
**Рисунок. Содержание цитокинов в вагинальном секрете обследованных женщин до начала терапии препаратом Эльжина и после ее окончания**

Figure. Cytokine level in patient vaginal smears before and after Elgyna therapy

Примечание. На рисунке показаны статистически значимые отличия: * — $p < 0,05$.Note. * — denotes significant differences ($p < 0.05$).

биоценоза [6], и требует назначения препаратов, направленных на восстановление микрофлоры влагалища после терапии [9].

Особое внимание в исследовании уделялось балансу провоспалительных (TNF, IL-6) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов, являющихся важными местными иммунологическими факторами [10]. Основными функциями TNF α являются повышение продукции металлопротеаз и катепсина, что приводит к деградации коллагена и эластина в межклеточном матриксе и, как следствие, к усилению трансудации жидкости и выделений; угнетение липогенеза, снижающее уровень короткоцепочечных жирных кислот, что проявляется нарушением баланса между нормальной и патогенной флорой; усиление воздействия на гипоталамо-гипофизарную систему, что может провоцировать гормональные изменения; активное участие в воспалительной реакции; торможение клеточной пролиферации и дифференцировки; индукция продукции других провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IFN γ , GM-CSF). Основными функциями IL-6 являются индукция синтеза белков острой фазы, активация Т-клеток, стимуляция продукции иммуноглобулинов В-клетками. Основными функциями IL-10 являются уменьшение интенсивности воспалительных реакций; угнетение продукции провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF α , IFN γ); усиление синтеза секреторного IgA.

Кариопикнотический индекс при нормальной реакции слизистой оболочки влагалища изменяется в строгой зависимости от силы гормонального влияния. Так, стимуляция эстрогенами вызывает повышение КПИ, а прогестерон и андрогены обладают способностью подавлять пролиферативные изменения, вызванные эстрогенами. Учитывая изменения КПИ под действием гормонов, одной из задач исследования была оценка влияния гормонального компонента препарата Эльжина (преднизолона) на пролиферацию эпителия влагалища, а именно на отсутствие угнетения пролиферации под действием преднизолона. Результаты исследования установили отсутствие угнетения пролиферации эпителия влагалища под действием гормонального компонента препарата Эльжина.

В ходе проведенного исследования было установлено, что использование комбинированного

препарата, содержащего орнидазол, неомицин, преднизолон, эконазол, у женщин с БВ, НВГ и КВВ снижает лейкоцитарную реакцию отделяемого мочеполовых органов (по данным микроскопии), а также секрецию провоспалительного цитокина TNF α в вагинальном секрете, приводит к смещению баланса в сторону противовоспалительных цитокинов и, как следствие, способствует регрессу клинических симптомов БВ и НВГ. При этом не происходит угнетения пролиферативной способности эпителия влагалища.

В настоящее время общепринятой в лечении воспалительных заболеваний слизистой влагалища является двухэтапная концепция, заключающаяся в использовании антибактериальной терапии с последующим восстановлением микрофлоры [2, 3]. На наш взгляд, эту концепцию следовало бы дополнить и третьим этапом, заключающимся в коррекции местного иммунитета, направленной на нормализацию баланса про- и противовоспалительных цитокинов. Как правило, коррекция иммунного ответа должна быть направлена на подавление локальной воспалительной реакции. Эффект от такой терапии может сохраняться более длительное время, учитывая склонность к хроническому течению и рецидивированию как бактериального вагиноза, так и вагинита, что позволяет использовать Эльжину при повторных схемах терапии, учитывая ее эффективность, безопасность и отсутствие клинически значимых побочных эффектов.

Выводы

Применение препарата Эльжина снижает секрецию провоспалительного цитокина TNF α в вагинальном секрете и приводит к смещению баланса в сторону противовоспалительных цитокинов, что с точки зрения противовоспалительной терапии является патогенетическим обоснованием для его назначения женщинам с бактериальным вагинозом и неспецифическим вагинитом.

Через семь дней после окончания терапии препаратом Эльжина происходит уменьшение клинической симптоматики, нормализация показателей микроскопии отделяемого мочеполовых органов, а эффект от проведенного лечения сохраняется до пяти недель.

Применение препарата Эльжина не приводит к угнетению пролиферации эпителия влагалища.

Список литературы/References

1. Кира Е.Ф., Артымук Н.В., Беженарь В.Ф., Савичева А.М., Гайтукиева Р.А., Гамирова Е.В., Белякина И.В., Мелько А.И. Многоцентровое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности Вагилака в терапии бактериального вагиноза // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. 2015. № 2 (38). С. 125–136. [Kira E.F., Artyumuk N.V., Bezhenar V.F., Savicheva A.M., Gaitukieva R.A., Gamirova E.V., Belyakina I.V., Melko A.I. Multicenter randomized placebo-controlled trial of the effectiveness and safety of Vagilak in therapy for bacterial vaginosis. *Reproduktivnoe zdorovie. Vostochnaia Evropa = Reproductive Health. Eastern Europe, 2015, no. 2 (38), pp. 125–136. (In Russ.)*]

2. Кира Е.Ф., Пекарев О.Г., Молчанов О.Л., Мальцева Л.И., Аксененко В.А., Селихова М.С., Летяева О.И., Минаев Н.Н., Коршакова Н.Ю. Сравнительный анализ эффективности и безопасности параллельного или последовательного сочетания метронидазола с молочной кислотой и двухэтапного метода метронидазол плюс пробиотик. Многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование // *Акушерство и гинекология*. 2016. № 9. С. 87–93. [Kira E.F., Pekarev O.G., Molchanov O.L., Maltseva L.I., Aksenenko V.A., Selikhova M.S., Letyaeva O.I., Minaev N.N., Korshakova N.Yu. Comparative analysis of the efficiency and safety of parallel or sequential combination of metronidazole with lactic acid and a two-stage regimen including metronidazole plus a probiotic: a multicenter randomized controlled study // *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2016, no. 9, pp. 87–93 (In Russ.)] doi: 10.18565/aig.2016.9.87-93
3. Клинические рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин. М.: Российское общество акушеров-гинекологов, 2019. 56 с. [Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of diseases accompanied by pathological discharge from the genital tract of women. Moscow: Russian Community of Obstetrician-Gynecologists, 2019. 56 p. (In Russ.)]
4. Кремлева Е.А., Сгибнев А.В., Шетинина Ю.С. Изучение влияния комбинации антимикробных препаратов и преднизолона в форме преднизолона натрия фосфата на микробиологическое состояние нижних отделов женских половых органов // *Акушерство и гинекология*. 2019. № 11. С. 209–215. [Kremleva E.A., Sgibnev A.V., Shchetinina Yu.S. Study of the effect of a combination of antimicrobial agents and prednisolone in the form of prednisolone sodium phosphate on the microbiological state of the lower female genitalia. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2019, no. 11, pp. 209–215. (In Russ.)] doi: 10.18565/aig.2019.11.209-214
5. Кузнецова И.В. Диагностика и терапия смешанных и рецидивирующих вульвовагинальных инфекций // *Медицинский алфавит*. 2019. Т. 3, № 25 (400). С. 29–36. [Kuznetsova I.V. Diagnosis and therapy of mixed and recurrent vulvovaginal infections. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2019, vol. 3, no. 25 (400), pp. 29–36. (In Russ.)] doi: 10.33667/2078-5631-2019-3-25(400)-29-36
6. Ледина А.В., Прилепская В.Н. Состояние микробиоценоза влагалища, бактериальный вагиноз и возможности его лечения // *Consilium Medicum*. 2013. Т. 15, № 6. С. 48–50. [Ledina A.V., Prilepskaya V.N. The condition of the vaginal microecocenosis, bacterial vaginosis and the possibilities of its treatment. *Consilium Medicum*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 48–50. (In Russ.)]
7. Озолиня Л.А., Праведников Н.Н., Овсепян Н.Р. Современный взгляд на этиологию, патогенез, клинику и лечение воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин (обзор литературы) // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2013. № 2. С. 47–52. [Ozolinya L.A., Righteous N.N., Hovsepyan N.R. Modern look on the etiology, pathogenesis, symptoms and treatment of pelvic inflammatory diseases in women (review). *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2013, no. 2, pp. 47–52. (In Russ.)]
8. Резолюция совета экспертов по итогам заседания «Заболевания, сопровождающиеся патологическими выделениями из половых путей женщин» в рамках 33-го европейского конгресса международного союза по борьбе с инфекциями, передаваемыми половым путем (IUSTI). Эстония, Таллин, 5–7 сентября 2019 г. // *Акушерство и гинекология*. 2019. № 10. С. 207–216. [Resolution of the council of experts on the results of the meeting on diseases accompanied by pathologic genital discharge in women at the 33rd Europe Congress of the International Union Against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) held in Tallinn, Estonia, on September 5–7, 2019. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2019, no. 10, pp. 207–216. (In Russ.)] doi: 10.18565/aig.2019.10.207-210
9. Савичева А.М., Тапильская Н.И., Шипицына Е.В., Воробьева Н.Е. Бактериальный вагиноз и аэробный вагинит как основные нарушения баланса вагинальной микрофлоры. Особенности диагностики и терапии // *Акушерство и гинекология*. 2017. № 5. С. 24–31. [Savicheva A.M., Tapilskaya N.I., Shipitsyna E.V., Vorobyeva N.E. Bacterial vaginosis and aerobic vaginitis as major vaginal microflora balance disorders: Diagnostic and therapeutic characteristics. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2017, no. 5, pp. 24–31. (In Russ.)] doi: 10.18565/aig.2017.5.24-31
10. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p. (In Russ.)]
11. Guzel A.B., Ilkit M., Akar T., Burgut R., Demir S.C. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Medical Mycology*, 2011, vol. 49, no. 1, pp. 16–25. doi: 10.3109/13693786.2010.497972

Авторы:

Бокач О.М., врач акушер-гинеколог, ООО «Центр планирования семьи «Медика», Санкт-Петербург, Россия;
Мурашева М.С., врач акушер-гинеколог, ООО НПП «ИммуноБиоСервис», Санкт-Петербург, Россия;
Селькова М.С., к.м.н., врач иммунолог-аллерголог, ООО НПП «ИммуноБиоСервис», Санкт-Петербург, Россия;
Сторожева К.В., клинический ординатор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;
Чепанов С.В., к.м.н., старший научный сотрудник группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия;
Сельков С.А., д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Bokach O.M., Obstetrician Gynecologist, Center for Family Planning “Medica”, St. Petersburg, Russian Federation;
Murashova M.S., Obstetrician Gynecologist, ImmunoBioService Medical Center, St. Petersburg, Russian Federation;
Selkova M.S., PhD (Medicine), Immunologist-Allergologist, ImmunoBioService Medical Center, St. Petersburg, Russian Federation;
Storozheva K.V., Clinical Resident of the Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;
Chepanov S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Proteom Immunoregulation Group, Department of Immunology and Intercellular Interactions, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation;
Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology and Intercellular Interactions, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.04.2020
 Принята к печати 29.11.2020

Received 14.04.2020
 Accepted 29.11.2020

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ (УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

С.А. Перепелица^{1,2}, Л.А. Перминова¹, И.А. Степанян^{1,3}, Е.В. Захар³

¹ ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Россия

² НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, Москва, Россия

³ ГБУЗ Инфекционная больница Калининградской области, г. Калининград, Россия

Резюме. Селезенка является вторичным иммунным и самым крупным органом ретикуло-эндотелиальной системы, активно вовлекаемым в процесс при инфекционном мононуклеозе. Как правило, для диагностики спленомегалии используется только пальпаторное и перкуторное определение размеров селезенки, что является поздним и субъективным признаком вероятной спленомегалии. Ультразвуковое исследование дает широкие возможности в изучении ответа селезенки на течение инфекционного мононуклеоза. Целью настоящего исследования было выявление морфометрических и доплерографических изменений селезенки у пациентов с инфекционным мононуклеозом. *Материалы и методы.* Было обследовано 24 пациента с инфекционным мононуклеозом, составивших группу исследования. В контрольную группу вошли 30 здоровых студентов медицинского института. Всем участникам проводилось ультразвуковое исследование селезенки. Оценивались эхоструктура органа, четкость контура, измерялись линейные размеры: длина, ширина, толщина селезенки. Измерения скоростных показателей в селезеночной артерии и вене проводилось в области ворот селезенки. Позиционирование эластографического окна при фиброэластометрии выполнялось в окне стандартного серошкального исследования. Измерения производились в 5 и более точках паренхимы селезенки с отступом от капсулярной зоны и зоны крупных сосудов не менее чем на 4–5 мм. На основании полученных морфометрических измерений были проведены расчеты массы и коэффициента массы селезенки (КМС), отношения массы селезенки к росту и площади поверхности тела. *Результаты.* В исследовании установлено, что у пациентов с инфекционным мононуклеозом длина, толщина и масса селезенки статистически значимо превышают соответствующие показатели здоровых лиц. Тем не менее масса органа варьирует в широких пределах, в связи с чем был выполнен расчет КМС, который является объективным критерием оценки размеров селезенки. Установлено, что при инфекционном мононуклеозе имеется три варианта ответа селезенки: уменьшение (КМС менее 1,5); сохранение нормальной величины (КМС находится в диапазоне от 1,5 до 4); спленомегалия (КМС более 4). Спленомегалия ассоциирована с повышением жесткости органа, пиковой скорости кровотока и давления в v. lienalis, а также с перипортальной лимфаденопатией. Выявленные изменения характерна для пациентов молодого возраста. *Заключение.* Ультразвуковое исследование селезенки имеет высокую диагностическую ценность для пациентов с инфекционным мононуклеозом. С по-

Адрес для переписки:

Перепелица Светлана Александровна
236041, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14,
ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта.
Тел.: 8 (401) 246-15-30.
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru

Contacts:

Svetlana A. Perepelitsa
236041, Russian Federation, Kaliningrad, A. Nevskiy str., 14,
Immanuel Kant Baltic Federal University.
Phone: +7 (401) 246-15-30.
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru

Для цитирования:

Перепелица С.А., Перминова Л.А., Степанян И.А., Захар Е.В.
Морфометрическая характеристика селезенки при инфекционном
мононуклеозе (ультразвуковое исследование) // Инфекция и иммунитет.
2021. Т. 11, № 3. С. 556–564. doi: 10.15789/2220-7619-MCO-1481

Citation:

Perepelitsa S.A., Perminova L.A., Stepanyan I.A., Zakhar E.V. Splenic
morphometric characteristics in infectious mononucleosis (ultrasonic
study) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2021, vol. 11, no. 3, pp. 556–564. doi: 10.15789/2220-7619-MCO-1481

мошью данного метода возможно точно оценить состояние иммунных органов в остром периоде болезни. На доклиническом этапе возможна градация спленомегалии в зависимости от степени ее выраженности, оценка гемодинамики и жесткости органа.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, селезенка, ультразвук, спленомегалия, масса селезенки, коэффициент массы селезенки.

SPLENIC MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS (ULTRASONIC STUDY)

Perepelitsa S.A.^{a,b}, Perminova L.A.^a, Stepanyan I.A.^{a,c}, Zakhar E.V.^c

^a Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russian Federation

^c Infectious Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The spleen is a secondary immune and the largest organ of the reticuloendothelial system, actively involved during infectious mononucleosis. Clinically, assessing a degree of organ involvement in the pathological process seems unlikely. As a rule, only palpation and percussion are used to determine the size of the spleen, which represents a late and subjective sign of potential splenomegaly. Ultrasound examination provides ample opportunities to estimate the spleen size during infectious mononucleosis. Our study was aimed at identifying morphometric and Doppler ultrasound changes in the spleen in patients with infectious mononucleosis. *Materials and methods.* There were enrolled 24 patients with infectious mononucleosis to be compared with 30 healthy medical institute students in control group. All participants underwent splenic ultrasound examination. Spleen echotexture and contour clarity together with measuring linear dimensions: length, width, and thickness were analyzed. Splenic artery and vein velocity parameters were measured at the gates of the spleen. Elastographic window for fibroelastometry was positioned within the window for standard gray-scale examination. Measurements were performed at 5 or more points of the spleen parenchyma at least 4–5 mm away from the capsular zone and the zone of large vessels. Based on the morphometric measurements obtained, the mass, spleen mass coefficient (SMC), as well as the spleen mass/body height ratio and spleen mass/body surface area ratio were calculated. *Results.* We found that patients with infectious mononucleosis had the length, thickness and weight of the spleen significantly greater than those observed in control group. However, the mass of the spleen varies widely and justified to calculate the CMS as an objective criterion to assess the size of the spleen. It was revealed that infectious mononucleosis may proceed in one of the three variants of the splenic response: decreased size, CMR < 1.5; normal size, CMR ranged from 1.5 to 4; splenomegaly, CMR > 4. Splenomegaly is associated with increased organ stiffness, peak blood flow velocity and pressure in v. lienalis, as well as periportal lymphadenopathy. Identified changes are characteristics of young patients. *Conclusion.* Ultrasound examination of the spleen is of high diagnostic value for patients with infectious mononucleosis allowing highly accurate assessment state of the immune organs in the acute disease period. At the preclinical stage, gradation of splenomegaly is possible depending on its intensity, assessed hemodynamics and organ stiffness.

Key words: infectious mononucleosis, spleen, ultrasound, splenomegaly, spleen mass, spleen mass coefficient.

Введение

Инфекционный мононуклеоз (ИМ) является распространенным заболеванием, вызванным вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). В настоящее время в мире инфицированность взрослого населения вирусом Эпштейна–Барр достигает 90%–95% [9, 13]. Анализ эпидемиологической ситуации на территории Российской Федерации за 16 лет свидетельствует о росте заболеваемости во всех возрастных группах (12,8 на 100 000 населения) [3, 4]. За последние 25 лет в нашей стране выявлен устойчивый рост заболеваемости ИМ, существует цикличность подъема и снижения с временным интервалом в 5–7 лет. Все регионы страны ранжированы по уровню многолетней заболеваемости. К регионам с низким уровнем заболеваемости ИМ относятся

республики Дагестан, Кабардино-Балкарская, Калмыкия, Карачаево-Черкесская, Северная Осетия — Алания, Чеченская, Алтай, Бурятия, Тыва, Якутия (Саха) и Оренбургская область. В Вологодской, Пензенской, Самарской, Свердловской и Тюменской областях, республиках Карелия, Удмуртия, Камчатском крае и Севастополе уровень заболеваемости выше среднего, а в Ярославской и Томской областях и Санкт-Петербурге средняя многолетняя заболеваемость инфекционным мононуклеозом оценена как высокая [6].

Возникновение ИМ зависит от возраста и пола, распространенности ВЭБ у людей, уровня сероконверсии. Симптомы заболевания бывают серьезными и могут сохраняться в течение длительного времени [15, 29]. Возраст пациента является одним из главных факторов, опреде-

ляющих наличие патогномичных симптомов заболевания. Классическая триада ИМ (лихорадка, боль в горле и лимфаденопатия) характерна и для детей, и для взрослых. Однако у пациентов детского возраста чаще появляются неспецифические симптомы болезни: сыпь, кашель, диарея, насморк, обезвоживание и судороги. Увеличение лимфоидных органов (лимфатических узлов, селезенки и печени) характерно для взрослых пациентов [20]. Проспективное исследование Dunmire S.K. и соавт. показало, что у молодых людей в возрасте от 19 до 22 лет в 75% развивается типичный ИМ, в остальных случаях заболевание протекает в бессимптомной или стертой формах [14, 15]. В старших возрастных группах ИМ также чаще протекает в бессимптомной или стертой формах [10, 14].

Учитывая непредсказуемость течения ИМ и высокую вероятность тяжелых форм этого заболевания у пациентов старшей возрастной группы, а также принимая во внимание возможность роста частоты и тяжести течения ИМ в ближайшие годы [18, 20, 31], актуальным становится раннее прогнозирование и предотвращение осложнений с помощью ультразвуковой и морфометрической характеристик селезенки.

Спленомегалия — достаточно распространенное явление, которое может быть вызвано широким спектром заболеваний, включая ИМ [20], гематологические заболевания и цирроз печени [30]. Ультразвуковое исследование (УЗИ) селезенки является перспективным методом, которое позволяющим точно определить нормальные размеры органа в различных возрастных группах и при патологических состояниях [26].

Цель исследования — выявить морфометрические и доплерографические изменения селезенки у пациентов с ИМ.

Материалы и методы

Данное проспективное исследование было одобрено Независимым этическим комитетом Центра клинических исследований ФГАОУ ВО БФУ им. И. Канта и выполнено в ГБУЗ «Инфекционная больница Калининградской области». В исследование включили 24 пациента с инфекционным мононуклеозом, которые составили основную группу (группа «ИМ»). Для всех пациентов было характерно острое начало заболевания, повышение температуры тела до 38–40°C, боль в горле, признаки тонзиллита, лимфаденопатия. Лечение начиналось в амбулаторных условиях, но не давало клинического эффекта, что служило поводом для госпитализации в инфекционный стационар. Длительность заболевания на момент поступления в стационар составляла 10 суток [7, 5, 14]. Диагноз ИМ устанавливался на основании

характерной клинической картины и специфических лабораторных критериев.

Критерий включения в исследование: клинические и лабораторные признаки инфекционного мононуклеоза. В группу сравнения («Здоровые») было включено 30 здоровых молодых людей. Критерий включения в исследование — отсутствие признаков острых инфекционных или обострение хронических заболеваний в течение последних двух месяцев. Все участники подписывали информированное добровольное согласие на включение в исследование.

Основные клинические характеристики обследованных представлены в табл. 1. Пациенты группы «ИМ», по сравнению с представителями группы «Здоровые», имели статистически значимо больший возраст ($p = 0,002$), но по основным антропометрическим характеристикам статистически значимых отличий между группами выявлено не было ($p > 0,05$).

Ультразвуковое исследование проводилось на аппарате Aixplorer (SuperSonic Imagine, Франция) конвексным датчиком с частотой 1–6 МГц. Во время стандартного исследования селезенки оценивались эхоструктура органа, четкость контура, ее однородность. Линейные измерения селезенки проводились в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. Измерялась длина, ширина и толщина органа. Доплерографические исследование кровотока в селезеночных сосудах проводили при спокойном дыхании и положении пациента на правом боку с заведенной за голову левой верхней конечностью. В области ворот селезенки проводилось измерение пиковой систолической скорости кровотока (PSVa) и градиента давления в а. lienalis (PGa), средней линейной скорости кровотока

Таблица 1. Основные клинические характеристики пациентов, М (SD)

Table 1. The main clinical characteristics of patients, M (SD)

Показатель Indicator	Группа «ИМ» Group «IM» n = 24	Группа «Здоровые» Group «Healthy» n = 30	p
Возраст, лет Age, years	33,4±16,6*	25,6±3,7	0,002
Масса тела, кг Body weight, kg	75,8±14,6	71±15,1	0,2
Рост, см Height, cm	173,8±9	171±17	0,3
S тела, м ² S body, m ²	1,89±0,2	1,82±0,2	0,2

Примечание. * $p < 0,05$ — статистически значимые различия между группами.

Note. * $p < 0.05$ — significant intergroup differences.

(PSVv) и градиента давления в v. lienalis (PGv). Фиброэластометрия (ФЭМ) селезенки выполнена только в группе «ИМ», так как основное условие для применения метода — значительная спленомегалия. Конвексный датчик устанавливался параллельно межреберным промежуткам. Позиционирование эластографического окна проводилось в окне стандартного серошкального исследования. Измерения выполнялись в 5 и более точках паренхимы селезенки с отступом от капсулярной зоны и зоны крупных сосудов не менее чем на 4–5 мм.

На основании морфометрических данных произведены расчеты массы селезенки и коэффициентов по методике Возгомент О.В. и соавт:

- математический расчет массы селезенки (M_c) проведен по следующей формуле: $M_c = 0,34 \times L^2 \times h$, где L — длина селезенки, h — толщина селезенки (в см);
- математический расчет коэффициента массы селезенки (КМС) проведен по формуле: $1000m/\text{масса тела ребенка}$ (в граммах);
- математический расчет отношения массы селезенки к росту (К1) проведен по формуле: $\text{масса селезенки (г)}/\text{рост ребенка (см)}$;
- математический расчет отношения массы селезенки к площади поверхности тела (Кs) проведен по формуле: $\text{масса селезенки (г)}/\text{площадь поверхности тела ребенка (м}^2\text{)}$ [2];
- математический расчет площади поверхности тела по формуле Мостеллера (1987 г.).

Статистический анализ был проведен с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для данных, распределение которых в вариационном ряду носило

нормальный характер, использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD). Для количественных признаков, отличных от нормального распределения, определяли медиану (Me) и межквартильный размах ($Q1; Q3$). В исследуемой выборке качественные данные анализировались путем вычисления доли наблюдений (в процентах). Сравнение групп по качественному признаку проводилось с помощью критерия χ^2 или точного критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

При проведении ультразвукового сканирования установлено, что у всех обследованных селезенка имеет четкий контур, паренхима однородная, изоэхогенная. Результаты морфометрического исследования органа представлены в табл. 2.

В исследовании показано, что у пациентов группы «ИМ», по сравнению с лицами группы «Здоровые», длина и толщина селезенки статистически значимо больше ($p = 0,007$ и $p = 0,005$ соответственно). На основании полученных морфометрических параметров рассчитаны масса селезенки и коэффициенты КМС, К1, Кs. У пациентов группы «ИМ» средняя масса селезенки оказалась в 1,7 раза больше, чем у лиц группы «Здоровые». Данное отличие является статистически значимым ($p = 0,0006$). На рис. 1 представлена диаграмма размаха средних величин массы селезенки: видно, что в каждой группе ее масса варьирует в широких пределах. Однако на основании только этого параметра нельзя судить о наличии или отсутствии

Таблица 2. Сравнительный анализ морфометрических и расчетных показателей селезенки, M (SD)

Table 2. Comparative analysis of splenic morphometric and calculated parameters, M (SD)

Показатель Parameter	Группа «ИМ» Group "IM" n = 24	Группа «Здоровые» Group "Healthy" n = 30	p
Длина селезенки, см Spleen length, cm	12,1±2,6*	10,5±1,5	0,007
Толщина селезенки, см Spleen thickness, cm	5,5±1,5*	4,6±0,7	0,005
Ширина селезенки, см The width of the spleen, cm	6,3±1,8	5,8±1,7	0,3
Масса селезенки, г Spleen mass, g	306,7±175,3*	178,2±70	0,0006
Коэффициент массы селезенки, КМС Spleen mass coefficient (SMC)	4,1±2,4	3,3±1,3	0,1
Отношение массы селезенки к росту, К1 Spleen mass/body height ratio (K1)	1,7±0,9*	1±0,4	0,0007
Отношение массы селезенки к площади поверхности тела, Кs Spleen mass/body surface area ratio (Ks)	160,4±88,1*	98,3±37,7	0,001

Примечание. * $p < 0,05$ — статистически значимые различия между группами.

Note. * $p < 0.05$ — significant intergroup differences.

спленомегалии, так как масса селезенки зависит от антропометрических показателей индивидуума.

В связи с этим рассчитывался объективный критерий, исключающий влияние этих факторов и отражающий морфометрическую характеристику селезенки — коэффициент ее массы, КМС (рис. 2). В исследовании не выявлено статистически значимых отличий средних значений КМС между группами ($p > 0,05$), но при детальном анализе установлено, что в группе «ИМ» исследуемый показатель варьирует в широком диапазоне, в то время как в группе «Здоровые» он ограничен меньшим интервалом. Для проведения подробного анализа каждая группа в зависимости от величины КМС разделена на 4 подгруппы: КМС менее 1,5; КМС в диапазоне от 1,6 до 3,9; КМС в диапазоне от 4 до 6 и КМС более 6,1. Полученные результаты представлены на рис. 3. В обеих группах выявлены лица с КМС менее 1,5, но в группе «ИМ» таких пациентов статистически значимо больше, чем в группе «Здоровые» ($p = 0,02$).

Коэффициент массы селезенки в диапазоне от 1,6 до 3,9 характерен для 76,7% группы «Здоровые» и 25% пациентов группы «ИМ». Выявленные отличия являются статистически значимыми ($p = 0,0001$). Большинство здоровых молодых людей имеют КМС в этом диапазоне, в связи с чем его можно считать нормативным показателем. Полученные данные совпадают с данными исследований других авторов [2, 21]. Можно считать, что КМС менее 1,5 является признаком уменьшения селезенки, а КМС бо-

лее 4 — признаком спленомегалии. Чем выше коэффициент, тем больше выражено увеличение селезенки.

Спленомегалия различной степени выраженности зарегистрирована в обеих группах. У 20,8% пациентов в группе «ИМ» и у 13,3% лиц из группы «Здоровые» КМС находится в диапазоне от 4 до 6. Увеличение КМС от 6 до 8,9 обнаружено у 33,3% пациентов группы «ИМ» и в 6,7% случаев в группе «Здоровые». Данное отличие является статистически значимым ($p = 0,01$). С помощью ультразвукового исследования установлено, что у каждого второго пациента с ИМ имеется спленомегалия различной степени выраженности.

Известно, что типичное течение ИМ, включающее спленомегалию, характерно для молодых людей в возрасте от 19 до 22 лет, а в старшем возрасте заболевание может протекать без увеличения селезенки. В нашем исследовании установлено, что в группе «ИМ» КМС более 4 характерен для пациентов со средним возрастом $24,4 \pm 7,5$ лет. Средний возраст пациентов с КМС в диапазоне от 1,5 до 4 составляет $47,8 \pm 20,6$ лет, а с КМС менее 1,5 — $39,4 \pm 15,9$ лет. Возраст пациентов с КМС более 4 статистически значимо меньше, чем возраст пациентов с КМС менее 1,5 ($p = 0,01$) и в диапазоне от 1,5 до 4 ($p = 0,002$). Для лиц молодого возраста характерна спленомегалия, в более старшем возрасте этот симптом может отсутствовать.

В группе «ИМ» при проведении корреляционного анализа выявлена отрицательная связь



Рисунок 1. Средние показатели массы селезенки

Figure 1. Average spleen mass

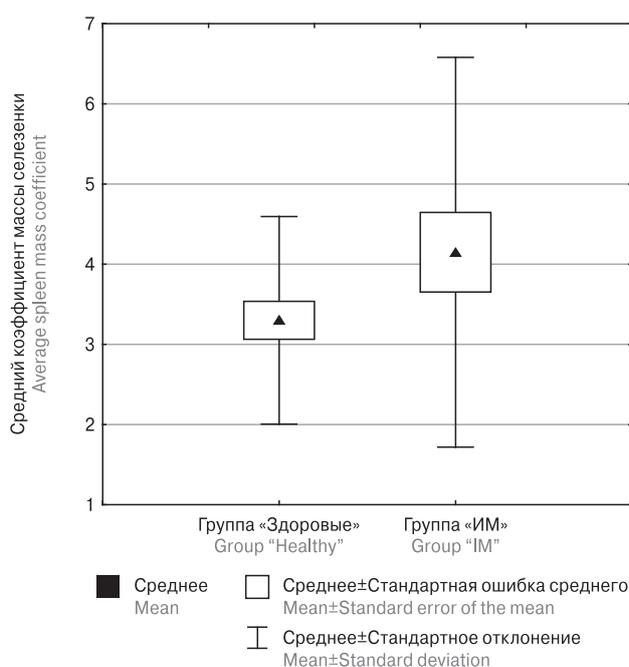


Рисунок 2. Средний коэффициент массы селезенки (КМС)

Figure 2. Average spleen mass coefficient (SMC)

средней силы между КМС и возрастом: $r = -0,54$, $p = 0,006$. В группе «Здоровые» корреляционная связь между указанными показателями отсутствует.

Коэффициенты K_I и K_s являются дополнительными расчетными величинами, подтверждающими или опровергающими степень выраженности спленомегалии. Исследование показало, что у пациентов группы «ИМ», по сравнению со здоровыми людьми, K_I и K_s статистически значимо выше ($p = 0,0007$ и $p = 0,001$).

Фиброэластометрия проводилась только пациентам из группы «ИМ» при увеличенной массе селезенки. Повышение жесткости селезенки выявлено у 33,3% пациентов со средним возрастом $25,4 \pm 9,5$ лет и значением КМС $6,4 \pm 1,6$. Средняя величина жесткости составляла $22 \pm 3,6$ кПа.

Изучив гемодинамические параметры селезенки (табл. 3), мы установили, что $PSVa$ и PGa в а. lienalis не имеют статистически значимых различий в изучаемых группах ($p > 0,05$). Однако скоростные характеристики в v. lienalis статистически значимо различаются: в группе «ИМ» $PSVv$ ($p = 0,004$) и PGv ($p = 0,02$) статистически значимо выше, чем в группе «Здоровые».

В группе «ИМ» при проведении корреляционного анализа выявлены следующие связи между КМС и гемодинамическими параметрами сосудов селезенки:

- положительная связь средней силы между КМС и $PSVa$: $r = 0,5$, $p = 0,01$;
- положительная связь средней силы между КМС и PGa : $r = 0,5$, $p = 0,02$;
- положительная связь средней силы между КМС и $PSVv$: $r = 0,64$, $p = 0,0009$;

В группе «Здоровые» при проведении корреляционного анализа также выявлены следующие связи между КМС и гемодинамическими параметрами:

- положительная связь средней силы между КМС и $PSVv$: $r = 0,5$, $p = 0,006$;
- положительная связь средней силы между КМС и PGv : $r = 0,46$, $p = 0,01$.

Таблица 3. Сравнительный анализ гемодинамических показателей сосудов селезенки, M (SD), Me [Q1; Q3]

Table 3. Comparative analysis of hemodynamic parameters for splenic blood vessels, M (SD), Me [Q1; Q3]

Показатель Parameter	Группа «ИМ» Group "IM" n = 24	Группа «Здоровые» Group "Healthy" n = 30	p
PSVa, cm/s	57,7±14,5	53,2±18,3	0,3
PG a, mm Hg	1,4±0,7	1,2±1	0,4
PSVv, cm/s	23,7±12,6*	16,3±4,3	0,004
PGv, mm Hg	0,14 [0,12; 0,3]*	0,1 [0,08; 0,14]	0,02

Примечания. * $p < 0,05$ — статистически значимые различия между группами; $PSVa$ — пиковая систолическая скорость кровотока в а. lienalis; PGa — градиент давления в а. lienalis; $PSVv$ — средняя линейная скорость кровотока в v. lienalis; PGv — градиент давления в v. lienalis.
Notes. * $p < 0,05$ — statistically significant differences between groups; $PSVa$ — peak blood flow velocity in a. lienalis; PGa — pressure gradient in a. lienalis; $PSVv$ — average linear blood flow velocity in v. lienalis; PGv — blood pressure gradient in v. lienalis.

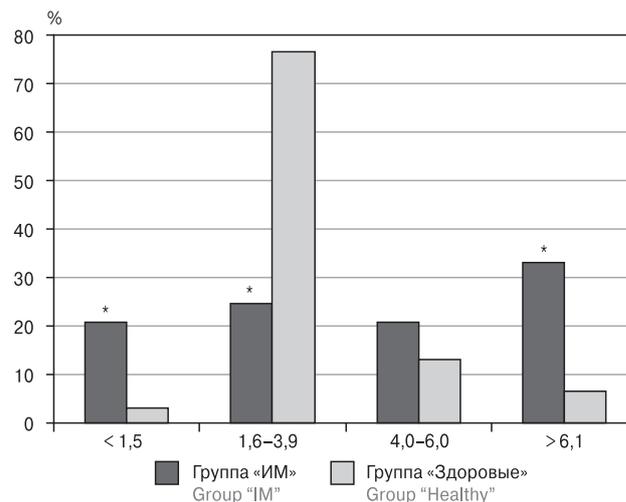


Рисунок 3. Ранжирование пациентов по размеру КМС

Figure 3. SMC size patient ranking

Ультразвуковое исследование позволило установить наличие ответа в других иммунных органах, в частности в лимфатических узлах (ЛУ). В группе «ИМ» в 20,8% наблюдений обнаружены спленомегалия (средняя величина КМС составляла $6,7 \pm 1,8$) и увеличенные перипортальные ЛУ, средний размер которых составлял $16,7 \pm 3,7$ мм. Сочетание этих признаков выявлено у пациентов со средним возрастом $21,3 \pm 3,1$ лет. В одном случае спленомегалия сочеталась с увеличением перипортальных и селезеночных ЛУ. В группе «Здоровые» не выявлено увеличения ЛУ.

Обсуждение

Селезенка участвует в формировании иммунного ответа организма на определенную инфекцию. Симптомы ИМ являются результатом инфильтрации лимфоидных органов, в том числе селезенки, специфически активированными клетками. Чем больше обнаруживается

активированных лимфоцитов, тем более яркой становится и клиническая картина заболевания. Степень ее выраженности зависит от состояния иммунной системы, возраста пациента, продолжительности болезни, наличия спленомегалии, локальной или генерализованной лимфаденопатии [20].

В большинстве источников литературы авторы описывают только клинически значимую спленомегалию. Определение точных размеров с помощью пальпации и перкуссии невозможно. Без ультразвукового исследования нельзя предположить спленомегалию в ее начальной стадии у каждого конкретного пациента. С помощью ультразвука на ранней стадии болезни можно объективно оценить состояние селезенки, получить точные размеры органа и подтвердить наличие или отсутствие спленомегалии [17, 22]. Коэффициент массы селезенки можно считать объективным и универсальным критерием оценки органа в разных возрастных группах [2, 5, 21]. В нашем исследовании с помощью ультразвука у 54,1% пациентов молодого возраста установлена спленомегалия, что совпадает с данными других авторов [1, 7, 16]. Течение ИМ у людей молодого возраста сопровождается спленомегалией и повышением жесткости органа, перипортальной лимфаденопатией.

Установлено, что для ИМ характерны три варианта изменений размеров селезенки: микро脾ения, нормальные размеры органа и спленомегалия. Крайне важен также симптом микро脾ении. В исследовании установлено, что у части пациентов с ИМ имеет место уменьшение размера селезенки. Та же особенность была выявлена у здоровых молодых людей без какой-либо клинической симптоматики. Такие пациенты также должны пройти углубленное обследование для поиска причины уменьшения органа.

Только с помощью ультразвука можно провести градацию изменения органа и определить выраженность спленомегалии. Это позволит выделить группу индивидуального наблюдения, в которую войдут пациенты со значительной спленомегалией, вероятностью развития тяжелого течения ИМ, осложнений.

Значительная спленомегалия при ИМ ассоциирована с риском развития опасных для здоровья и жизни осложнений. Примерно у 0,1–0,5% пациентов может возникнуть разрыв селезенки [11, 12, 27]. Сроки возникновения этого осложнения точно не установлены. Клинически у пациента появляется нетипичная для ИМ жалоба: боль различной интенсивности в левом верхнем квадранте живота. Боль сопровождается появлением бледности кожных покровов, нестабильностью гемодинамики. Спленомегалия сама по себе не сопровождается болью, но появление новой жалобы указывает на возможное

повреждение селезенки. Ультразвуковое исследование служит быстрым и чувствительным методом диагностики разрыва селезенки, обнаружения свободной жидкости и является методом выбора у гемодинамически нестабильных пациентов. Компьютерная томография является подтверждающим методом, позволяющим врачу оценить степень повреждения селезенки [8, 27].

Инфаркт селезенки также является редким, но тоже клинически значимым осложнением ИМ [19, 23, 24, 25, 28]. Характеризуется широким спектром клинических проявлений: от субклинических до яркой клинической картины. Наиболее часто инфаркт селезенки развивается у молодых людей, не имеющих хронических заболеваний; время появления симптомов — в диапазоне от 1 до 25 дней. У всех пациентов диагностируется спленомегалия [19, 23]. Патогенез инфаркта селезенки все еще не до конца изучен. Предложено несколько вариантов механизма его развития. Во-первых, во время разгара заболевания артериальное кровоснабжение гиперплазированной селезенки может быть недостаточным, что приводит к инфаркту органа. Во-вторых, было предположено наличие кратковременного гиперкоагуляционного состояния [23]. В нашем исследовании показано, что гемодинамические показатели в а. lienalis не различаются в исследуемых группах, но у пациентов с ИМ пиковая скорость кровотока и пиковый градиент давления в v. lienalis повышены, т. е. имеются нарушения в системе венозного оттока.

Основными причинами инфаркта селезенки являются тромбоэмболия вследствие гемодинамических нарушений, появления гиперкоагуляции и гематологических сдвигов [24, 25].

Распространенность зон инфаркта и их локализацию можно детально изучить только с помощью ультразвукового исследования. При этом существует несколько вариантов инфаркта селезенки: гипеохогенная зона в нижнем полюсе [24]; множественные участки гипеохогенности [28]. Применение контрастного вещества позволяет улучшить ультразвуковую визуализацию органа: на фоне спленомегалии определяются гипеохогенные клиновидные участки с отсутствием кровотока [28].

Пациенты с инфекционным мононуклеозом, имеющие спленомегалию, находятся в группе риска развития этих осложнений.

Заключение

Ультразвуковое исследование селезенки имеет высокую диагностическую ценность для пациентов с инфекционным мононуклеозом. С помощью данного метода возможна точная оценка состояния иммунных органов в остром периоде

болезни. Установлено, что не у всех пациентов течение заболевания сопровождается вовлечением селезенки и лимфатических узлов в патологический процесс. На доклиническом этапе возможна градация спленомегалии в зависимости от степени ее выраженности, оценка гемодинамики и жесткости органа. Это дает возможность

выделить группу пациентов со значительной спленомегалией для динамического ультразвукового контроля, прогнозирования возможных осложнений, эффективности лечения в стационаре. Описанная нами методика позволяет более точно определить изменения иммунных органов при инфекционном мононуклеозе.

Список литературы/References

1. Бондаренко А.Л., Савиных М.В., Савиных Н.А., Калужских Т.И., Хлебникова Н.В., Малкова Л.В., Рябова Н.В. Возрастные отличия инфекционного мононуклеоза Эпштейна–Барр вирусной этиологии // Журнал инфектологии. 2018. Т. 10, № 1. С. 36–41. [Bondarenko A.L., Savinykh M.V., Savinykh N.A., Kaluzhskikh T.I., Khlebnikova N.V., Malkova L.V., Ryabova N.V. Age differences of the Epstein–Barr infectious mononucleosis. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2018, vol. 10, no. 1, pp. 36–41. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2018-10-1-36-41
2. Возгомент О.В., Пыков М.И., Зайцева Н.В. Новые подходы к ультразвуковой оценке размеров селезенки у детей // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2013. № 6. С. 56–62. [Vozgoment O.V., Pykov M.I., Zaitseva N.V. Ultrasound assessment of spleen size in children. New Approaches. *Ul'trazvukovaya i funktsional'naya diagnostika = Ultrasound and Functional Diagnostics*, 2013, no. 6, pp. 56–62. (In Russ.)]
3. Касымова Е.Б., Башкина О.А., Галимзянов Х.М. Ключевые вопросы диагностики и лечения инфекционного мононуклеоза // Астраханский медицинский журнал. 2016. Т. 11, № 3. С. 38–44. [Kasymova E.B., Bashkina O.A., Galimzyanov Kh.M. Key issues of diagnosis and treatment of infectious mononucleosis. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2016, vol. 11, no. 3, pp. 38–44. (In Russ.)]
4. Михнева С.А., Гришина Ю.Ю., Кухтевич Е.В., Мартынов Ю.В. Инфекционный мононуклеоз: характеристика проявлений эпидемического процесса // Инфекционные болезни: новости, мнение, обучение. 2017. № 5. С. 61–64. [Michneva S.A., Grishina Yu.Yu., Kukhtevich E.V., Martynov Yu.V. Infectious mononucleosis, epidemic process. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniye, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2017, no. 5, pp. 61–64. (In Russ.)] doi: 10.24411/2305-3496-2017-00086
5. Перепелица С.А., Алексеева С.В., Возгомент О.В. Ранние ультразвуковые признаки спленомегалии у новорожденных // Общая реаниматология. 2019. Т. 15, № 4. С. 58–66. [Perpelitsa S.A., Alekseeva S.V., Vozgoment O.V. Early ultrasound signs of splenomegaly in neonates. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2019, vol. 15, no. 4, pp. 58–66. (In Russ.)] doi: 10.15360/1813-9779-2019-4-58-66
6. Соломай Т.В. Динамика заболеваемости и территориальное распределение инфекционного мононуклеоза // Здравоохранение Российской Федерации. 2019. Т. 63, № 4. С. 186–192. [Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhraneniye Rossiyskoy Federatsii = Health Care of the Russian Federation*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 186–192. (In Russ.)]
7. Шайхуллина Л.Р., Валишин Д.А., Хунафина Д.Х., Хасанова Г.М., Галиева А.Т., Кутлугужина Ф.Г., Ишмухаметова А.Р. Клиническое течение инфекционного мононуклеоза в Республике Башкортостан // Международный академический вестник. 2016. Т. 15, № 3. С. 20–22. [Shaikhullina L.R., Valishin D.A., Hunafina D.H., Hasanova G.M., Galieva A.T., Kutluguzhina F.G., Ishmuhametova A.R. The clinical course of infectious mononucleosis in the Republic of Bashkortostan. *Mezhdunarodnyy akademicheskii vestnik = International Academic Bulletin*, 2016, vol. 15, no. 3, pp. 20–22. (In Russ.)]
8. Alaoui C.R., Rami M., Khatalla K., Elmadi A., Bouabdellah Y. Spontaneous rupture of the spleen in a child. *Pan. Afr. Med. J.*, 2019, vol. 32: 184. doi: 10.11604/pamj.2019.32.184.4260
9. Balfour H.H., Dunmire S.K., Hogquist K.A. Infectious mononucleosis. *Clin. Transl Immunology*, 2015, vol. 4, no. 2: e33. doi: 10.1038/cti.2015.1
10. Balfour H.H., Odumade O.A., Schmeling D.O., Mullan B.D., Ed J.A., Knight J.A., Vezina H.E., Thomas W., Hogquist K.A. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein–Barr virus infection in university students. *J. Infect. Dis.*, 2013, no. 207, pp. 80–88. doi: 10.1093/infdis/jis646
11. Barnwell J., Deol P.S. Atraumatic splenic rupture secondary to Epstein–Barr virus infection. *BMJ Case Rep.*, 2017: bcr2016218405. doi: 10.1136/bcr-2016-218405
12. Bartlett A., Williams R., Hilton M. Splenic rupture in infectious mononucleosis: a systematic review of published case reports. *Injury*, 2016, vol. 47, no. 3, pp. 531–538. doi: 10.1016/j.injury.2015.10.071
13. Cohen J.I. Epstein–Barr virus vaccines. *Clin. Transl Immunology*, 2015, vol. 4, no. 1: e32. doi: 10.1038/cti.2014.27
14. Dunmire S.K., Hogquist K.A., Balfour H.H. Infectious Mononucleosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, no. 390, pp. 211–240. doi: 10.1007/978-3-319-22822-8_9
15. Dunmire S.K., Verghese P.S., Balfour H.H. Jr. Primary Epstein–Barr virus infection. *J. Clin. Virol.*, 2018, no. 102, pp. 84–92. doi: 10.1016/j.jcv.2018.03.001
16. Ebell M.H. Epstein–Barr virus infectious mononucleosis. *Am. Fam. Physician*, 2004, vol. 70, no. 7, pp. 1279–1287.
17. Farukhi S.N., Fox J.C. The role of ultrasound in the management and diagnosis of infectious mononucleosis. *Crit. Ultrasound J.*, 2014, vol. 6, no. 1: 4. doi: 10.1186/2036-7902-6-4
18. Fourcade G., Germi R., Guerber F., Lupo J., Baccard M., Seigneurin A., Semenova T., Morand P., Epaulard O. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000–2016. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 4: e0175574. doi: 10.1371/journal.pone.0175574
19. Heo D.H., Baek D.Y., Oh S.M., Hwang J.H., Lee C.S., Hwang J.H. Splenic infarction associated with acute infectious mononucleosis due to Epstein–Barr virus infection. *Med. Virol.*, 2017, vol. 89, no. 2, pp. 332–336. doi: 10.1002/jmv.24618

20. Hocqueloux L., Causse X., Valery A., Jandali J.-C., Maitre O., Soin C., Buret J., Ouane F., Niang M., Mille C., Prazuck T., Guinard J., Guigon A. The high burden of hospitalizations for primary EBV infection: a 6-year prospective survey in a French hospital. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2015, vol. 21, no. 11: 1041.e1-7. doi: 10.1016/j.cmi.2015.07.015
21. Izranov V., Palvanova U., Gordova V., Perepelitsa S., Morozov S. Ultrasound criteria of splenomegaly. *The Radiologist*, 2019, vol. 1, no. 1002, pp. 3–6.
22. Lennon P., Crotty M., Fenton J.E. Infectious mononucleosis. *BMJ*, 2015, 350: h1825. doi: 10.1136/bmj.h1825
23. Li Y., George A., Arnaout S., Wang J.P., Abraham G.M. Splenic infarction: an under-recognized complication of infectious mononucleosis? *Open Forum Infect. Dis.*, 2018, vol. 5, no. 3: ofy041. doi: 10.1093/ofid/ofy041
24. Machado C., Salgado J.M., Monjardino L. The unexpected finding of a splenic infarction in a patient with infectious mononucleosis due to Epstein–Barr virus. *BMJ Case Rep.*, 2015, 2015: bcr2015212428. doi: 10.1136/bcr-2015-212428
25. Naviglio S., Abate M.V., Chinello M., Ventura A. Splenic infarction in acute infectious mononucleosis. *J. Emerg. Med.*, 2016, vol. 50 (1): e11-3. doi: 10.1016/j.jemermed.2015.09.019
26. Pelizzo G., Guazzotti M., Klersy C., Nakib G., Costanzo F., Andreatta E., Bassotti G., Calcaterra V. Spleen size evaluation in children: time to define splenomegaly for pediatric surgeons and pediatricians. *PLoS One*, 2018, vol. 13 (8): e0202741. doi: 10.1371/journal.pone.0202741
27. Sergeant S.R., Johnson S.M., Ashurst J., Johnston G. Epstein–Barr virus-associated atraumatic spleen laceration presenting with neck and shoulder pain. *Am. J. Case. Rep.*, 2015, no. 16, pp. 774–777. doi: 10.12659/ajcr.893919
28. Suzuki Y., Kakisaka K., Kuroda H., Sasaki T., Takikawa Y. Splenic infarction associated with acute infectious mononucleosis. *Korean. J. Intern. Med.*, 2018, vol. 33, no. 2, pp. 451–452. doi: 10.3904/kjim.2016.394
29. Rostgaard K., Balfour H.H., Jarrett R., Erikstrup C., Pedersen O., Ullum H., Nielsen L.P., Voldstedlund M., Hjalgrim H. Primary Epstein–Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS One*, 2019, vol. 14 (12): e0226436. doi: 10.1371/journal.pone.0226436
30. Rotbain E.C., Hansen D.L., de Muckadell O.S., Wibrand F., Meldgaard Lund A., Frederiksen H. Splenomegaly — diagnostic validity, work-up, and underlying causes. *PLoS One*, 2017, vol. 12 (11): e0186674. doi: 10.1371/journal.pone.0186674
31. Wemel A.C., Mayet A., Bellier S., Bigaillon C., Rapp C., Ficko C. Severe infectious mononucleosis in immunocompetent adults. *Med. Mal. Infect.*, 2017, vol. 47, no. 8, pp. 540–545. doi: 10.1016/j.medmal.2017.09.009

Авторы:

Перепелица С.А., д.м.н., профессор кафедры хирургических дисциплин ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории патологии клетки при критических состояниях НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНЦ РР, Москва, Россия;

Перминова Л.А., к.м.н., доцент кафедры терапии ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Россия;

Степанян И.А., аспирант и ассистент кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Россия; врач ультразвуковой диагностики, ГБУЗ Инфекционная больница Калининградской области, г. Калининград, Россия;

Захар Е.В., врач-инфекционист 1 инфекционного отделения, ГБУЗ Инфекционная больница Калининградской области, г. Калининград, Россия.

Authors:

Perepelitsa S.A., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Surgery, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Cell Pathology in Critical Conditions, V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russian Federation;

Perminova L.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapy, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation;

Stepanyan I.A., PhD Student, Assistant, Department of Fundamental Medicine, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation; Doctor of Ultrasound Diagnostics, Infectious Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation;

Zakhar E.V., Infectious Disease Doctor, 1st Infectious Department, Infectious Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Н.В. Епифанцева, Ю.А. Витковский, А.Н. Емельянова

ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия

Резюме. Острые кишечные инфекции (ОКИ) широко распространены и занимают второе место в структуре инфекционной патологии, уступая только респираторным заболеваниям. В связи с этим большое внимание уделяется изучению ОКИ, в том числе и иммунопатогенетическим механизмам их развития. Поскольку в развитии воспалительных реакций играют немаловажную роль провоспалительные и противовоспалительные цитокины, влияя на тяжесть и исход заболевания, закономерным становится изучение полиморфизма генов, контролирующих продукцию данных молекул. Таким образом, целью нашей работы стало изучение полиморфизма генов *IL-1 β T31C* и *IL-2 T330G*. Данные мутации характеризуются заменой нуклеотидов и затрагивают промоторные области генов, что влияет на скорость продукции и концентрацию соответствующих цитокинов. В исследовании приняли участие 108 пациентов с ОКИ, вошедшие в основную группу, и 94 здоровых человека — группа контроля. Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем проводилась реакция амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Определение полиморфизма генов *IL-1*, *IL-2* осуществлялось методом ПЦР с использованием праймеров ООО «Литех» (Санкт-Петербург). Обработка полученных данных проводилась с использованием статистического пакета Statistica 6. При изучении носительства полиморфных маркеров гена *IL-1 β T31C* с использованием мультипликативной модели наследования в обеих группах обнаружено преобладание нормальной аллели *T* и соответственно генотипов *-31TT* и *-31TC*; $OR = 1,83$ и интервалом $1,04-3,22$ ($\chi^2 = 6,35$, $p = 0,04$, $df = 2$), что позволило выявить взаимосвязь между носительством гетерозиготного варианта гена *IL-1 β* с предполагаемо повышенным риском развития ОКИ. Что же касается гена *IL-2 T330G*, то среди больных ОКИ носителей патологической аллели *G* оказалось значительно больше, чем в среди здоровых людей. При анализе частоты носительства разных вариантов гена *IL-2 T330G* достоверно установлено, что среди больных ОКИ преобладали носители гетерозиготного варианта *TG* — 56,48% ($\chi^2 = 17,75$, $F = 0,000031$) и патологического генотипа *GG* — 13,89% ($\chi^2 = 12,31$, $F = 0,000663$), $p \leq 0,05$, с высокой вероятностью взаимосвязи носительства данных генотипов с риском развитием заболевания ($OR = 3,63$ [1,97–6,68] и $OR = 6,91$ [2,12–22,59]). Следовательно, носительство полиморфных вариантов генов *IL-1 β T31C* и *IL-2 T330G* ассоциировано с повышенным риском развития ОКИ в случае инфицирования патогенными микроорганизмами.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, воспаление, полиморфизм, цитокины, генотип, *IL-2 T330G*, *IL-1 β T31C*.

Адрес для переписки:

Епифанцева Наталья Владимировна
67200, Россия, Забайкальский край, г. Чита, ул. Горького, 39-А,
ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия.
Тел.: 8 (914) 433-55-38.
E-mail: en1608@yandex.ru

Contacts:

Natalya V. Epifantseva
67200, Russian Federation, Zabaykalsky Krai, Chita, Gorkogo str., 39-A,
Chita State Medical Academy.
Phone: +7 (914) 433-55-38.
E-mail: en1608@yandex.ru

Для цитирования:

Епифанцева Н.В., Витковский Ю.А., Емельянова А.Н. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при острых кишечных инфекциях // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 565–569. doi: 10.15789/2220-7619-POP-1268

Citation:

Epifantseva N.V., Vitkovsky Y.A., Emelyanova A.N. Polymorphism of pro-inflammatory cytokine genes in acute intestinal infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 565–569. doi: 10.15789/2220-7619-POP-1268

POLYMORPHISM OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN ACUTE INTESTINAL INFECTIONS

Epifantseva N.V., Vitkovsky Y.A., Emelyanova A.N.

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. Acute intestinal infections are widespread and hold the second place among infectious diseases, giving way solely to respiratory diseases. In this regard, much attention has been paid to examining acute intestinal infections, including immunopathogenetic mechanisms. And since proinflammatory and antiinflammatory cytokines play an important role in development of inflammatory reactions affecting disease severity and outcome, it becomes reasonable to study polymorphism of genes governing production of related molecules. Thus, the aim of our study was to examine the polymorphism in the IL-1 β *T31C* and IL-2 *T330G* genes; such mutations were characterized by nucleotide replacement affecting the gene promoters, which influenced production rate and level of the relevant cytokines. There were enrolled 108 patients with acute intestinal infections comprising main group as well as 94 apparently healthy subjects in the control group. Genomic DNA was isolated from the whole blood leukocytes by using a DNA-express-blood reagent, followed by conducting amplification reaction with two pairs of allele-specific primers. The polymorphism in the IL-1, IL-2 genes was determined by PCR with primers purchased from Litech LLC (St. Petersburg). Data processing was carried out by using the statistical Statistica 6 suite software. While assessing the carriage rate of IL-1 β *T31C* gene polymorphic markers by using the multiplicative inheritance model in both groups, the prevalence of the normal *T* allele and, respectively of the $-31TT$ and $-31TC$ genotypes with OR = 1.83 and an interval of 1.04–3.22 ($\chi^2 = 6.35$, $p = 0.04$, $df = 2$) was found, which allowed us to identify a relationship between the carriage of IL-1 β gene heterozygous variant and potentially elevated risk of AII. Regarding the IL-2 *T330G* gene, it was found that pathological *G* alleles was more markedly abundant in patients with acute intestinal infections compared to control group. Analyzing diverse IL-2 *T330G* carriage rate in patients with acute intestinal infections revealed that carriers of the *TG* heterozygous variant predominated — 56.48% ($\chi^2 = 17.75$, $F = 0.000031$), whereas pathological genotype *GG* was found in 13.89% ($\chi^2 = 12.31$, $F = 0.000663$, $p \leq 0.05$), with high probability of the relationship between carriage of these genotypes and a risk of disease development (OR — 3.63 [1.97–6.68] and OR — 6.91 [2.12–22.59]). Hence, the carriage of polymorphic variants of the IL-1 β *T31C* and IL-2 *T330G* genes was associated with elevated risk of developing AII in case of infection with pathogenic microorganisms.

Key words: acute intestinal infections, inflammation, polymorphism, cytokines, genotype, IL-2 *T330G*, IL-1 β *T31C*.

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) по-прежнему занимают лидирующие позиции в структуре инфекционных заболеваний и стоят на втором месте после острых респираторных заболеваний. По данным Роспотребнадзора, в РФ за 2018 заболеваемость ОКИ, вызванными установленными бактериальными и вирусными возбудителями, составила 179,24 на 100 тыс. населения, а ОКИ неустановленной этиологии — 348,80 на 100 тыс. населения. При этом у некоторых ОКИ протекают в легкой форме с быстрым выздоровлением, а у других отмечается тяжелое течение с развитием осложнений, и в этом немаловажную роль играет носительство полиморфных вариантов генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, так как образование и высвобождение высокоактивных молекул жестко регулируется генетическими механизмами [2]. «Нормальные» аллели генов по отдельности имеют слабый эффект, но их совокупность приводит к формированию особенностей иммунитета, predisposing к развитию инфекционного заболевания [3]. Так, уровень продукции некоторых цитокинов ассоциирован с определенными аллелями этих цитокинов. Например, аллель *A* в *G308A* гена фактора некроза опухолей- α (TNF α) и аллель *TC589T* интерлейкина-4 (IL-4)

ответственны за повышенную транскрипцию генов, в результате чего повышается продукция цитокинов TNF α и IL-4. Значительное повышение концентрации данных цитокинов способствует быстрому прогрессированию заболевания и более тяжелому течению. Для гена интерлейкина-10 (IL-10) определяется замена в трех участках: -1082 , -819 , -592 [4,5,7,8].

Цель данной работы — изучить частоту встречаемости полиморфных маркеров гена IL-1 β (*T31C*), гена IL-2 (*T330G*) при острых кишечных инфекциях.

Материалы и методы

Нами было проведено обследование цельной крови 108 пациентов, находившихся на стационарном лечении с диагнозом «острая кишечная инфекция». Группу контроля составили здоровые — 94 человека. Определение полиморфизма генов IL-1 β , IL-2 осуществлялось методом ПЦР с использованием праймеров ООО «Литех» (Санкт-Петербург). Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем проводилась реакция амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров.

Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при соблюде-

Таблица 1. Распространенность полиморфизма гена IL-1 (T31C)

Table 1. Prevalence of IL-1 (T31C) gene polymorphism

Аллели и генотипы Alleles and genotypes	Случаи/Cases (n = 108)		Контроль/Control (n = 94)		Всего/Total	
	абс./abs.	отн./rel.	абс./abs.	отн./rel.	абс./abs.	отн./rel.
Аллель T/Allele T	147		126			
Аллель C/Allele C	69		62			
Генотип TT/Genotype TT	46	42,59	46	48,94	92	45,54
Генотип TC/Genotype TC	55	50,93	34	36,17	89	44,06
Генотип CC/Genotype CC	7	6,48	14	14,89	21	10,4

нии равновесия Харди–Вайнберга и для сравнения распределения частот генотипов в группах использовался критерий χ^2 . В случае малого количества наблюдений использовался точный критерий Фишера. Для оценки шанса влияния отдельных генотипов использовалась таблица сопряженности 2×2 ($df = 1$), а для оценки гетерогенности влияния генотипов на развитие заболевания — таблица сопряженности 3×2 ($df = 2$) при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета Statistica 6.

Результаты

Уровень экспрессии рецепторов в определенной степени зависит от аллельных вариантов полиморфных локусов, частота встречаемости которых может иметь значительные различия при патологических процессах. Например, известно, что дисбаланс в продукции IL-1 (IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI) влияет на характер протекания воспалительных заболеваний и является одним из пусковых механизмов патологических

процессов [1]. При изучении частот генотипов и аллелей гена IL-1 β (C31T) в основной и контрольной группах условия равновесия Харди–Вайнберга были соблюдены и соответствовали 1, что позволило для дальнейшего анализа использовать мультипликативную и общую модели наследования. В результате проведенного исследования носительства полиморфных вариантов гена IL-1 β (C31T) установлено, что во всех группах превалирует носительство нормальной аллели T, при этом в группе контроля преимущественно встречался нормозиготный генотип –31TT, у больных ОКИ преобладал гетерозиготный вариант –31TC с OR = 1,83 и интервалом 1,04–3,22 ($\chi^2 = 6,35$, $p = 0,04$, $df = 2$), что позволило выявить взаимосвязь между носительством данного варианта гена IL-1 с повышенным риском развития ОКИ (табл. 1, 3). Согласно же мультипликативной модели наследования, где $\chi^2 = 0,05$, $p = 0,82$ при $df = 1$ ОШ = 1,05 и 0,95, статистической значимости взаимосвязи носительства аллели –C или –T с риском развития заболевания не установлено (табл. 2).

Таблица 2. Мультипликативная модель наследования (тест хи-квадрат, df = 1)Table 2. Multiplicative inheritance model (χ^2 test, $df = 1$)

Аллели	Случаи Cases (n = 108)	Контроль Control (n = 94)	χ^2	P	OR	
					знач. values	95% CI
Аллель T Allele T	0,681	0,670	0,05	0,82	1,05	0,69–1,59
Аллель C Allele C	0,319	0,330			0,95	0,63–1,45

Таблица 3. Общая модель наследования (тест хи-квадрат, df = 2)Table 3. General inheritance model (χ^2 test, $df = 2$)

Генотипы Genotypes	Случаи Cases (n = 108)	Контроль Control (n = 94)	χ^2	P	OR	
					знач. values	95% CI
Генотип TT Genotype TT	0,426	0,489	6,35	0,04	0,77	0,44–1,35
Генотип TC Genotype TC	0,509	0,362			1,83	1,04–3,22
Генотип CC Genotype CC	0,065	0,149			0,40	0,15–1,03

Таблица 4. Распространенность полиморфизма гена IL-2 T330G

Table 4. Prevalence of IL-2 T330G gene polymorphism

Аллели и генотипы Alleles and genotypes	Случаи/Cases (n = 108)		Контроль/Control (n = 94)		Всего/Total	
	абс./abs.	отн./rel.	абс./abs.	отн./rel.	абс./abs.	отн./rel.
Аллель T/Allele T	125		149			
Аллель C/Allele C	91		39			
Генотип TT/Genotype TT	32	29,63	59	62,76	91	45,05
Генотип TC/Genotype TC	61	56,48	31	32,98	92	45,54
Генотип CC/Genotype CC	15	13,89	4	4,25	19	9,41

Таблица 5. Сравнение частот генотипов у пациентов с ОКИ и в группе контроля (хи-квадрат, критерий Фишера, отношения рисков)

Table 5. Comparison of genotype frequencies in patients with All and in the control group (Chi-square, F-test, odds ration)

Генотипы Genotypes	Случаи Cases (n = 108)	Контроль Control (n = 94)	χ^2	P	OR		F-критерий F-criterion
					знач. values	95% CI	
Генотип TT Genotype TT	32	59					
Генотип TC Genotype TC	61	31	17,75	0,05	3,63	1,97–6,68	0,000031
Генотип CC Genotype CC	15	4	12,31	0,05	6,91	2,12–22,59	0,000663

Что же касается распространенности полиморфизма гена IL-2 T330G, то установлено, что среди больных ОКИ носителей патологической аллели G значительно больше, чем в группе здоровых людей — соотношение составило 91:39 (табл. 4). Учитывая малое количество наблюдений в группе контроля (менее 5 случаев), был использован точный критерий Фишера. При анализе частоты носительства разных вариантов генотипов гена IL-2 T330G достоверно установлено, что среди больных ОКИ преобладали носители гетерозиготного варианта TG — 56,48% ($\chi^2 = 17,75$, F = 0,000031) и патологического генотипа GG — 13,89% ($\chi^2 = 12,31$, F = 0,000663), $p \leq 0,05$, с высокой вероятностью взаимосвязи носительства данных генотипов с риском развития заболевания (OR — 3,63 [1,97–6,68] и OR — 6,91 [2,12–22,59]) (табл. 5).

Продукция и концентрация цитокинов зависит от носительства различных вариантов соответствующих генов: например, у носителей мутантного гомозиготного варианта –31CC отмечается повышенное содержание IL-1 β в сыворотке крови, что, в свою очередь, приводит к активации

естественных киллеров [4, 6]. Мутация T330G затрагивает промоторную область гена IL-2 и характеризуется заменой тиминового на гуаниновый нуклеотид; можно предполагать, что именно она влияет на скорость транскрипции и трансляции кодируемого белка IL-2 Т-хелперно-индуцирующими клетками 1 клона [6].

В нашем исследовании у пациентов с ОКИ отмечено преимущественно носительство аллели G с преобладанием гетерозиготного (–330TG) и мутантного гомозиготного (–330GG) генотипов IL-2, а также гетерозиготного варианта –31TC IL-1 β с высоким уровнем прогностической значимости.

Заключение

В результате исследований установлено, что носительство полиморфных маркеров гена IL-2 T330G и IL-1 β T31C может быть ассоциировано с развитием ОКИ. Выявление данных вариантов генотипов может играть роль в прогнозировании повышенного риска развития и тяжести течения ОКИ.

Список литературы/References

- Анохова Л.И., Белокрыницкая Т.Е., Страмбовская Н.Н. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов у женщин с преждевременными родами // Сибирское медицинское обозрение. 2018. № 2. С. 52–55. [Anokhova L.I., Belokrinitskaya T.E., Strambovskaya N.N. Polymorphism of genes of proinflammatory cytokines in women with preterm birth. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2018, no. 2, pp. 52–55. (In Russ.)] doi: 10.20333/2500136-2018-2-52-55
- Бодиенкова Г.М., Титова Ж.В. Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании патологии (обзор) // Успехи современного естествознания. 2015. № 1–4. С. 616–620. [Bodienkova G.M., Titova Z.V.

- Polymorphism and gene expression cytokines in the formation of pathology (review). *Uspekhi sovremennogo estestvoznania = Advances in Current Natural Sciences*, 2015, no. 1–4, pp. 616–620. (In Russ.)]
3. Витковский Ю.А., Епифанцева Н.В. Уровень цитокинов и иммуноглобулинов у носителей полиморфных вариантов генов ИЛ-10 участка (G1082A) и ИЛ-4 участка (C589T) среди детей с коклюшной инфекцией // *Врач-аспирант*. 2012. № 3.4 (52). С. 602–606. [Vitkovsky Yu.A., Epifantseva N.V. Cytokine and immunoglobulin level in polymorphic variants of IL-10 (G1082a) and il-4 (C589t) gene region carriers among children with whooping cough. *Vrach-aspirant = Postgraduate Doctor*, 2012, no. 3.4 (52), pp. 602–606. (In Russ.)]
 4. Емельянова А.Н., Емельянов А.С., Витковский Ю.А. Полиморфизм промотора гена интерлейкина-2 (Т330G) при роже // *Врач-аспирант*. 2013. № 4.1 (59). С. 165–169. [Emelyanova A.N., Emelyanov A.S., Vitkovsky Yu.A. Polymorphism of the interleukin-2 (Т330G) gene promoter in erysipelas. *Vrach-aspirant = Postgraduate Doctor*, 2013, no. 4.1 (59), pp. 165–169. (In Russ.)]
 5. Коненков В.И., Ракова И.А., Максимов В.Н., Воевода М.И. Аллельный полиморфизм генов про- и противовоспалительных цитокинов при инфаркте миокарда в европеоидной популяции мужчин // *Бюллетень сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2006. № 2. С. 56–62. [Konenkov V.I., Rakova I.G., Maximov V.N., Voevoda M.I. Allelic polymorphism of genes pro-and anti-inflammatory cytokines at myocardial infarction in populations of men rum. *Bulleten' sibirskogo otdelenia Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Department of the Russian Academy of Sciences*, 2006, no. 2, pp. 56–62. (In Russ.)]
 6. Остапцева А.В., Шабалдин А.В., Ахматянова В.Р., Минина В.И., Глушков А.Н., Дружинин В.Г., Зоркольева И.В., Шабалдин Е.В., Глушкова О.А., Макараченко О.С. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма генов интерлейкина-4 у телеутов, шорцев и европеоидов Кемеровской области // *Медицинская иммунология*. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 737–740. [Ostapceva A.V., Shabaldin A.V., Akhmatianova V.R., Minina V.I., Glushkov A.N., Druzhinin V.G., Zorkoltseva I.V., Shabaldin E.V., Glushkova O.A., Makarchenko O.S., Ageeva T.N. Molecular genetic analysis of interleukin 4 gene polymorphism among teleutians, shorians, and caucasians in Kemerovo Region. *Medicinskaja immunologija = Medical Immunology (Russia)*, 2006, vol. 8, no. 5–6, pp. 737–740. (In Russ.)]
 7. Casanova J.-L., Abel L. Genetics dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Ann. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 20, pp. 581–620. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851
 8. Jones N.M., Holzman C., Friderici K.H., Jernigan K., Chung H., Wirth J., Fisher R. Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, vol. 87, no. 1–2, pp. 82–89. doi: 10.1016/j.jri.2010.06.158

Авторы:

Епифанцева Н.В., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия;
Витковский Ю.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия;
Емельянова А.Н., д.м.н., доцент, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия.

Authors:

Epifantseva N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation;
Vitkovsky Y.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation;
Emelyanova A.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.09.2019
 Отправлена на доработку 29.03.2020
 Принята к печати 14.04.2021

Received 10.09.2019
 Revision received 29.03.2020
 Accepted 14.04.2021

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИЕЙ *OPISTHORCHIS FELINEUS* С КОЖНЫМ СИНДРОМОМ

В.В. Цуканов¹, Е.Г. Горчилова², О.А. Коленчукова¹, И.И. Гвоздев¹, А.А. Савченко¹,
А.В. Васютин¹, Ю.Л. Тонких¹, О.С. Ржавичева², А.Г. Борисов¹

¹ НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия

² ЧУЗ КБ «РЖД-Медицина» города Красноярск, г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования — изучить функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов крови у больных с инвазией *Opisthorchis felineus* с кожным синдромом. *Материалы и методы.* Всего было обследовано 92 больных хроническим описторхозом, из них 38 пациентов (20 мужчин и 18 женщин, средний возраст 35,7±3,9 лет) были с кожным синдромом и 54 пациента (28 мужчин и 26 женщин, средний возраст 36,5±4,1 лет) без кожного синдрома, и 32 практически здоровых индивидуума (17 мужчин и 15 женщин, средний возраст 41,5 лет). Основным методом диагностики описторхоза являлось определение яиц или тел взрослых паразитов в дуоденальном содержимом и/или в кале, которое применялось у всех 92 пациентов. Фиброз печени определялся методом эластометрии по шкале METAVIR у всех 92 больных описторхозом. Исследование функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в крови было проведено всем 92 больным описторхозом и 32 здоровым лицам из группы контроля методом хемилюминесцентного анализа с измерением интенсивности выработки активных форм кислорода в спонтанной и зимозан-индуцированной реакции в люцигенин- и люминол-зависимых процессах. *Результаты.* У больных описторхозом с кожным синдромом, в сравнении с пациентами с описторхозом без кожного синдрома, была зарегистрирована более высокая частота болей в правом подреберье, диспепсии, астеновегетативного синдрома, кожного зуда, эозинофилии крови, гипербилирубинемии, холестатического синдрома, холецистита, гепатомегалии, а также содержание иммуноглобулина Е. Фиброз печени F3–F4 по METAVIR определялся у 18,4% больных описторхозом с кожным синдромом и у 11,1% лиц с описторхозом без кожного синдрома (ОШ = 1,78; ДИ 0,57–5,57; p = 0,5). Как в люминол-зависимом, так и в люцигенин-зависимом процессах у больных описторхозом с кожным синдромом, в сравнении с пациентами с описторхозом без кожного синдрома, регистрировалось значительное снижение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, о чем свидетельствовало значительное снижение максимальной интенсивности выработки активных форм кислорода и площади под кривой хемилюминесценции как в спонтанной, так и в индуцированной зимозаном реакции. *Заключение.* Полученные ре-

Адрес для переписки:

Цуканов Владислав Владимирович
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3-Г,
НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН.
Тел.: 8 (391) 256–81-71. Факс: 8 (391) 228–06-83.
E-mail: gastro@imprn.ru

Contacts:

Vladislav V. Tsukanov
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak str., 3-G, Research Institute of Medical Problems
of the North, Federal Research Center KSC SB RAS.
Phone: +7 (391) 256–81-71. Fax: +7 (391) 228–06-83.
E-mail: gastro@imprn.ru

Для цитирования:

Цуканов В.В., Горчилова Е.Г., Коленчукова О.А., Гвоздев И.И.,
Савченко А.А., Васютин А.В., Тонких Ю.Л., Ржавичева О.С., Борисов А.Г.
Метаболическая активность нейтрофилов крови у больных с инвазией
Opisthorchis felineus с кожным синдромом // Инфекция и иммунитет.
2021. Т. 11, № 3. С. 570–576. doi: 10.15789/2220–7619-MAO-1415

Citation:

Tsukanov V.V., Gorchilova E.G., Kolenchukova O.A., Gvozdev I.I.,
Savchenko A.A., Vasyutin A.V., Tonkikh J.L., Rzhavicheva O.S., Borisov A.G.
Metabolic activity of peripheral blood neutrophils in patients with
Opisthorchis felineus invasion and skin syndrome // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3,
pp. 570–576. doi: 10.15789/2220–7619-MAO-1415

Проект «Иммуно-биохимическая модель прогнозирования выраженности предракловых изменений в печени у больных хроническим описторхозом» проведен при поддержке ГКАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (код заявки: 2019051404996).

зультаты позволяют считать, что наличие кожного синдрома у больных описторхозом сопровождается более значимыми клинико-лабораторными проявлениями и снижением функциональной активности нейтрофилов крови, в связи с чем его можно считать маркером тяжести патологии.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, кожный синдром, нейтрофильные гранулоциты, функциональная активность, фиброз печени, активные формы кислорода, хемилюминесценция.

METABOLIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH *OPISTHORCHIS FELINEUS* INVASION AND SKIN SYNDROME

Tsukanov V.V.^a, Gorchilova E.G.^b, Kolenchukova O.A.^a, Gvozdev I.I.^a, Savchenko A.A.^a, Vasyutin A.V.^a, Tonkikh J.L.^a, Rzhavicheva O.S.^b, Borisov A.G.^a

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Private Healthcare Institution Clinical hospital "RZD-Medicine" of Krasnoyarsk City, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim was to examine functional activity of peripheral blood neutrophilic granulocytes in patients with *Opisthorchis felineus* invasion and skin syndrome. **Materials and methods.** A total of 92 patients with chronic opisthorchiasis were examined, of which 38 patients (20 males and 18 females, average age 35.7±3.9 years) and 54 patients (28 males and 26 females, average age 36.5±4.1 years) with/without skin syndrome, as well as 32 apparently healthy subjects (17 males and 15 females, average age 41.5 years). Detection of adult parasite eggs or bodies in the duodenal contents and/or feces was used as the major diagnostic method of opisthorchiasis used in all 92 opisthorchiasis patients. Liver fibrosis was assessed by elastometry method according to the METAVIR scale in all 92 opisthorchiasis patients. Functional activity of peripheral blood neutrophilic granulocytes was examined in all 92 opisthorchiasis patients and 32 healthy individuals from the control group by chemiluminescent analysis measuring intensity of reactive oxygen species production in spontaneous and zymosan-induced reactions in lucigenin and luminol-dependent processes. **Results.** Opisthorchiasis patients with vs. without skin syndrome suffered at higher rate from pain in the right hypochondrium, dyspepsia, astheno-vegetative syndrome, skin itching, blood eosinophilia, hyperbilirubinemia, cholestatic syndrome, cholecystitis, hepatomegaly, and had elevated serum immunoglobulin E level. Liver fibrosis F3–F4 according to METAVIR was determined in 18.4% and 11.1% of opisthorchiasis patients with vs. without skin syndrome (OR = 1.78; CI 0.57–5.57; p = 0.05). Both luminol- and lucigenin-dependent processes in opisthorchiasis patients with vs. without skin syndrome revealed significantly decreased functional activity of neutrophilic granulocytes which was evidenced by significantly decreased maximum intensity of reactive oxygen species production and the area under the chemiluminescence curve both in spontaneous and zymosan-induced reaction. **Conclusion.** The results suggest that the presence of skin syndrome in patients with opisthorchiasis is accompanied by more prominent clinical and laboratory manifestations, decreased functional activity of peripheral blood neutrophils, thereby allowing to consider it as a marker of intense pathology.

Key words: *Opisthorchis felineus*, skin syndrome, neutrophilic granulocytes, functional activity, liver fibrosis, reactive oxygen species, chemiluminescence.

Введение

Патология печени и желчевыводящей системы является одной из значимых проблем в гастроэнтерологии [2, 3]. Частой причиной билиарных заболеваний у населения Российской Федерации является описторхоз [4]. На территории нашей страны зарегистрировано 23 эпидемических очага этого паразитоза [7]. В некоторых населенных пунктах, расположенных на Иртыше и Оби, распространенность инвазии *Opisthorchis felineus* достигает 50% [1].

Нейтрофилы играют важную роль в защите печени от различных инфекций [13]. Помимо своей способности лизировать патогены, нейтрофилы обладают высоким потенциалом регуляции иммунного ответа [10]. В этой связи изучение активности нейтрофильных гранулоцитов у больных описторхозом, имеющих клинические особенности, представляется безусловно актуальным.

Материалы и методы

Работа была выполнена на базе гастроэнтерологического отделения ЧУЗ «Клиническая больница "РЖД-Медицина" города Красноярск» и клиники НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН. Всего обследовано 92 больных хроническим описторхозом, среди них было 38 пациентов (20 мужчин и 18 женщин, средний возраст 35,7±3,9 лет) с кожным синдромом, 54 пациента (28 мужчин и 26 женщин, средний возраст 36,5±4,1 лет) без кожного синдрома и 32 практически здоровых пациента (17 мужчин и 15 женщин, средний возраст 41,5 лет) в возрасте от 24 до 60 лет.

Клиническая симптоматика и анамнестические сведения изучались у всех обследованных с применением стандартной анкеты, разработанной на основании действующих международных классификаций [12]. Кожный синдром диагностировался на консультации врача-дер-

матолога. У большинства пациентов наблюдались проявления аллергической крапивницы, характеризующиеся локальными, немного приподнятыми высыпаниями бледно-розового цвета, сопровождающимися зудом. У некоторых больных наблюдались проявления кольцевидной гранулемы или ксантоматозной сыпи.

Основным методом диагностики описторхоза являлось определение яиц или тел взрослых паразитов в дуоденальном содержимом и/или в кале, которое применялось для всех 92 пациентов.

Дуоденальное зондирование осуществлялось после предварительной трехдневной подготовки с ограничениями в диете газообразующих продуктов, сладких, жирных блюд и после 12-часового голодания. Выполнялось получение трех порций желчи — А, В и С (дуоденальная, пузырная и печеночная), извлеченных до и после стимулирования двигательной активности желчного пузыря. Для стимулирования двигательной активности желчного пузыря применяли 30 мл 30%-ного раствора сернокислой магнезии. Исследование продолжалось в течение всего времени истечения пузырной порции и еще 15–20 минут после появления светлой печеночной порции. Для каждой порции определялся объем, цвет, выполнялось ее макроскопическое описание, в последующем проводилась микроскопия нативных мазков желчи по 5–10 образцов из всех порций. Наиболее информативными считались порции «В» и «С». Также при углубленном поиске выполнялась микроскопия и осадка желчи после ее центрифугирования с целью увеличения эффективности поиска яиц описторхисов.

Исследование фекалий на наличие описторхоза проводилось по методу Като — методу толстого мазка под целлофаном. Толстый мазок представляет собой слой неразбавленных фекалий на предметном стекле, спрессованный под листком тонкого гигроскопичного целлофана, предварительно пропитанного глицерином.

Всем пациентам проводили развернутый и биохимический анализ крови. Развернутый анализ крови проводился с подсчетом лейкоцитарной формулы для уточнения наличия и определения степени эозинофилии, лейкоцитоза и повышения СОЭ. В биохимическом анализе крови определяли признаки нарушения синтетической, секреторной и детоксицирующей функций печени, наличие цитолитического, холестатического и мезенхимально-воспалительного печеночных синдромов. Всем пациентам проводились эзофагогастродуоденоскопия и ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости.

Для диагностики фиброза печени осуществлялась эластометрия печени у всех 92 паци-

ентов с описторхозом на ультразвуковых системах Aixplorer (SuperSonic Imagine, Франция) или Siemens Acuson S2000 (Siemens Healthineers, Германия). Данный метод основан на графическом изображении движения сдвиговой волны с количественной оценкой эластичности обследуемого участка ткани в килопаскалях (кПа). Оценка фиброза проводилась по шкале METAVIR [11]. Выделялось 4 степени фиброза в зависимости от выявляемых показателей эластичности печени: F0 — $\leq 5,8$ кПа, фиброз отсутствует; F1 — 5,9–7,2 кПа; F2 — 7,3–9,5 кПа; F3 — 9,6–12,5 кПа; F4 — $\geq 12,6$ кПа, цирроз печени.

Группа контроля набиралась из здоровых лиц, которые во время профилактического осмотра не предъявляли гастроэнтерологических жалоб, не имели выраженных хронических заболеваний различных органов и систем, отрицали злоупотребление алкоголем, характеризовались нормальными показателями клинического и биохимического анализов крови, отсутствием маркеров к вирусным гепатитам и антител к описторхисам.

Исследование функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в крови было проведено всем 92 больным описторхозом и 32 здоровым лицам из группы контроля. Интенсивность выработки активных форм кислорода (АФК) в культуре нейтрофильных гранулоцитов крови изучалась методом хемилюминесцентного анализа. Определялась активность люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и индуцированной зимозаном хемилюминесценции. С помощью люцигенина исследовались первичные АФК (супероксидный анион), с помощью люминола — вторичные АФК (H_2O_2 , $\cdot OH$, $HClO$). Спонтанная хемилюминесценция показывает базовый уровень функциональной активности нейтрофилов, при стимуляции зимозаном определяются резервные возможности клеток. Хемилюминесцентная активность оценивалась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL3606 (СКТБ «Наука», Россия). Определяли следующие характеристики функциональной активности клеток: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}) и площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Вычисляли индекс активации (ИА) фагоцитоза путем отношения S в зимозан-индуцированной реакции к S в спонтанной реакции.

Исследование выполнялось с разрешения этического комитета ФИЦ КНЦ СО РАН (протокол № 4 от 02.08.2019). Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, в соответствии

Таблица 1. Данные инструментальных и лабораторных исследований у больных описторхозом в зависимости от наличия кожного синдрома

Table 1. Instrumental and laboratory data of examining patients with opisthorchiasis with/without skin syndrome

	Пациенты с описторхозом с кожным синдромом Opisthorchiasis patients with skin syndrome (n = 38)		Пациенты с описторхозом без кожного синдрома Opisthorchiasis patients without skin syndrome (n = 54)		ОШ (ДИ); p OR (CI); p
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Эозинофилия крови (более 5%) Blood eosinophilia (more than 5%)	23	60,5	10	18,5	6,43 (2,54–16,27); < 0,001
Гипербилирубинемия Hyperbilirubinemia	14	36,8	6	11,1	4,42 (1,55–12,56); = 0,007
Содержание IgE (ME) IgE content (ME)	304,2±27,8		186,6±17,7		< 0,001
Холестатический синдром Cholestatic syndrome	15	39,5	7	13,0	4,18 (1,53–11,38); = 0,007
Признаки холецистита Signs of cholecystitis	25	65,8	21	38,9	2,94 (1,25–6,91); = 0,02
Гепатомегалия Hepatomegaly	21	55,3	7	13,0	7,78 (2,88–21,06); < 0,001

Примечание. Достоверность различий показателей вычислена при помощи отношения шансов и t-критерия Стьюдента.

Note. The significance of differences in parameters was calculated by using the odds ratio and Student's t-test.

Таблица 2. Характеристики функциональной активности нейтрофилов в люминол-зависимом процессе у пациентов с описторхозом в зависимости от наличия кожного синдрома

Table 2. Characteristics of neutrophil functional activity in the luminol-dependent process in patients with opisthorchiasis with/without skin syndrome

Показатель Indicator		Здоровые лица Healthy persons n = 32; Me (C ₂₅ –C ₇₅)	Пациенты с описторхозом с кожным синдромом Opisthorchiasis patients with skin syndrome n = 38; Me (C ₂₅ –C ₇₅)	Пациенты с описторхозом без кожного синдрома Opisthorchiasis patients without skin syndrome n = 54; Me (C ₂₅ –C ₇₅)	P ₁₋₂	P ₂₋₃	P ₁₋₃
Спонтанная реакция Spontaneous reaction	Tmax, с Tmax, s	968 (422–1846)	1485 (367–2332)	1306 (346–2278)	= 0,4	= 0,7	0,6
	Imax, о.е. Imax, r.u.	29 535 (21 513–59 322)	8127 (3769–14 886)	14 749 (8 059–22 934)	< 0,001	= 0,01	= 0,002
	S, × 10³ о.е. S, × 10 ³ r.u.	87 970 (64 189–207 122)	29 647 (21 078–51 783)	54 081 (29 932–82 586)	< 0,001	= 0,008	= 0,004
Зимозан-индуцированная реакция Zymosan-induced reaction	Tmax, с Tmax, s	972 (677–1132)	1194 (647–1798)	1070 (627–1678)	= 0,7	= 0,8	= 0,8
	Imax, о.е. Imax, r.u.	184 438 (89 636–236 610)	27 656 (15 578–47 638)	46 322 (28 035–73 857)	< 0,001	= 0,01	< 0,001
	S, × 10³ о.е. S, × 10 ³ r.u.	439 016 (259 634–643 438)	84 765 (36 479–144 746)	152 031 (84 675–204 785)	< 0,001	= 0,007	< 0,001
Индекс активации фагоцитоза Phagocytosis activation index	3,68 (2,16–4,98)	2,55 (1,67–3,65)	2,83 (1,78–3,84)	= 0,2	= 0,8	= 0,4	

Примечание. Достоверность различий показателей определена с помощью критерия Манна–Уитни. Tmax — время выхода на максимум хемилюминесценции, секунды. Imax — максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, относительные единицы флуоресценции. S — площадь под кривой хемилюминесценции, относительные единицы флуоресценции.

Note. The significance of differences in parameters was assessed by using the Mann-Whitney test. Tmax — time to reach the maximum chemiluminescence, seconds. Imax — maximum value of chemiluminescence intensity, relative fluorescent unit. S — area under the chemiluminescence curve, relative fluorescent unit.

с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, регламентирующей проведение научных исследований.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере при помощи пакета прикладных программ Statistica (версия 7.0) и SPSS v.12.0. Для количественных показателей выборки, имеющей нормальное распределение, вычислялись средняя арифметическая (M), среднее квадратичное отклонение (s), средняя ошибка средней арифметической (m). Достоверность различий средних определялась в доверительном интервале более 95% с помощью Т-критерия Стьюдента. В случае распределения вариационного ряда отличного от нормального производилось вычисление медианы (Me) и интерквартильного размаха ($C_{25}-C_{75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для анализа статистической значимости различий качественных признаков использовалось вычисление отношения шансов (ОШ) и доверительного интервала (ДИ) для ОШ. Достоверным считается уровень значимости при $p \leq 0,05$.

Результаты

Мы сопоставили частоту клинических симптомов у больных описторхозом в зависимости от наличия кожного синдрома. У больных описторхозом с кожным синдромом, в сравнении с пациентами с описторхозом без кожного синдрома, была зарегистрирована более высокая частота болей в правом подреберье (55,3% против 31,5%; ОШ = 2,63; ДИ 1,13–6,15; $p = 0,04$), диспепсии (44,7% против 22,2%; ОШ = 2,77; ДИ 1,13–6,75; $p = 0,04$), астеновегетативного синдрома (78,9% против 37,0%; ОШ = 6,04; ДИ 2,37–15,40; $p < 0,001$) и кожного зуда (57,9% против 16,7%; ОШ = 6,53; ДИ 2,54–16,80; $p < 0,001$). По результатам лабораторных и инструментальных исследований у больных описторхозом с кожным синдромом частота эозинофилии крови, гипербилирубинемии, холестатического синдрома, холецистита, гепатомегалии, а также содержание иммуноглобулина Е (IgE) являлись значительно более высокими, чем у лиц с паразитозом без кожного синдрома (табл. 1).

Полученные данные представляются весьма логичными. Чем активнее воздействуют паразитарные антигены на организм, тем более выраженной становится аллергическая реакция, проявляющаяся в том числе в развитии кожного синдрома. С другой стороны, массивное поступление описторхисов обуславливает выраженное поражение печени и желчевыво-

дящих путей, сопровождающееся появлением клинической симптоматики. В этой связи можно полагать, что развитие кожного синдрома является маркером тяжести патологического процесса в организме, вызванного инвазией *Opisthorchis felineus*.

Фиброз печени F3–F4 по METAVIR определялся у 18,4% больных описторхозом с кожным синдромом и у 11,1% лиц с описторхозом без кожного синдрома (ОШ = 1,78; ДИ 0,57–5,57; $p = 0,5$).

Мы исследовали хемилюминесцентным методом выработку АФК, которая характеризует функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов. Также определяли спонтанную выработку АФК нейтрофилами, а также применяли их стимулирование зимозаном для оценки их способности отвечать на дополнительную антигенную нагрузку. Люминол-зависимая реакция показывала продукцию всего пула АФК. Люцигенин-зависимый процесс позволил изучить продукцию супероксидного радикала ферментом НАДФН-оксидазой на внешней мембране клеток.

В люминол-зависимом процессе у пациентов с описторхозом из обеих групп регистрировалось значительное снижение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в сравнении со здоровыми лицами, о чем свидетельствовало значительное снижение максимальной интенсивности выработки АФК (I_{max}) и площади под кривой (S) хемилюминесценции как в спонтанной реакции, так и в индуцированной зимозаном реакции. Аналогичные закономерности регистрировались у больных описторхозом с кожным синдромом в отличие от лиц с описторхозом без кожного синдрома (табл. 1). Эти данные подтверждались при исследовании продукции АФК нейтрофильными гранулоцитами в люцигенин-зависимом процессе (табл. 2 и 3).

Обсуждение

Следует подчеркнуть, что течение описторхоза характеризуется высокой частотой аллергических и кожных симптомов. Обследование 732 детей школьного возраста в Томске выявило гельминтоз у 34,9% пациентов, атопические симптомы в виде экземы или риноконъюнктивита обнаруживались у 12,4% обследованных [6]. Авторы из Лаоса получили аналогичные результаты при обследовании 536 детей в возрасте 13–14 лет с инвазией *Opisthorchis viverrini* [9]. Таким образом, выбранная нами тема является весьма актуальной. Лечение таких пациентов является сложной проблемой.

Роль нейтрофилов в развитии заболеваний печени не вызывает сомнений [13]. Признано,

Таблица 3. Характеристики функциональной активности нейтрофилов в люцигенин-зависимом процессе у пациентов с описторхозом в зависимости от наличия кожного синдрома

Table 3. Characteristics of neutrophil functional activity in the lucigenin-dependent process in opisthorchiasis patients with/without skin syndrome

Показатель Indicator		Здоровые лица Healthy persons n = 32; Me (C ₂₅ -C ₇₅)	Пациенты с описторхозом с кожным синдромом Opisthorchiasis patients with skin syndrome n = 38; Me (C ₂₅ -C ₇₅)	Пациенты с описторхозом без кожного синдрома Opisthorchiasis patients without skin syndrome n = 54; Me (C ₂₅ -C ₇₅)	P ₁₋₂	P ₂₋₃	P ₁₋₃
Спонтанная реакция Spontaneous reaction	Tmax, с Tmax, s	1279 (934-1836)	1803 (1196-2373)	1568 (1028-2154)	= 0,06	= 0,2	= 0,3
	Imax, о.е. Imax, r.u.	13 538 (6113-23 063)	2164 (1076-3458)	3311 (2185-5798)	< 0,001	= 0,01	< 0,001
	S, × 10 ³ о.е. S, × 10 ³ r.u.	42 524 (23 651-88 288)	6737 (3765-10 848)	10 109 (6579-18 563)	< 0,001	= 0,02	< 0,001
Зимозан-индуцированная реакция Zymosan-induced reaction	Tmax, с Tmax, s	1164 (897-1495)	1304 (982-1563)	1267 (944-1511)	= 0,7	= 0,8	= 0,8
	Imax, о.е. Imax, r.u.	18 518 (10 963-45 006)	3863 (1521-5472)	5240 (3637-7256)	< 0,001	= 0,04	< 0,001
	S, × 10 ³ о.е. S, × 10 ³ r.u.	65 540 (34 814-162 326)	10 284 (6476-15 352)	16 044 (11 348-22 854)	< 0,001	= 0,003	< 0,001
Индекс активации фагоцитоза Phagocytosis activation Index	1,46 (0,95-2,28)	1,74 (0,97-2,64)	1,67 (0,85-2,78)	= 0,5	= 0,9	= 0,6	

Примечание. Достоверность различий показателей определена с помощью критерия Манна-Уитни. Tmax — время выхода на максимум хемилюминесценции, секунды. Imax — максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, относительные единицы флуоресценции. S — площадь под кривой хемилюминесценции, относительные единицы флуоресценции.

Note. The significance of differences in parameters was assessed by using the Mann-Whitney test. Tmax — time to reach the maximum chemiluminescence, seconds. Imax — maximum value of chemiluminescence intensity, relative fluorescent unit. S — area under the chemiluminescence curve, relative fluorescent unit.

что эти клетки играют ведущую роль в защите от инфекционных агентов [8]. Снижение функциональной активности нейтрофилов может быть одной из ведущих причин повреждения печени [5]. При развитии воспаления нейтрофилы активно взаимодействуют с такими важными цитокинами, как IFN γ , фактор некроза опухоли и IL-10 [14]. К сожалению работы по изучению функционального состояния нейтрофилов у больных с инвазией *Opisthorchis felineus* практически отсутствуют.

Заключение

Мы обнаружили значительное снижение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в крови у больных описторхозом с кожным синдромом в сравнении с пациентами с описторхозом без кожного синдрома. Клинико-биохимические показатели также свидетельствовали о том, что кожный синдром следует рассматривать как маркер тяжести инвазии *Opisthorchis felineus*.

Список литературы/References

1. Мордвинов В.А., Фурман Д.П. «Обская болезнь» — недооцененная опасность // Наука в России. 2013. Т. 195, № 3. С. 15–24. [Mordvinov V.A., Furman D.P. Ob' disease — underestimated threat. *Nauka v Rossii = Science in Russia*, 2013, vol. 195, no. 3, pp. 15–24. (In Russ.)]
2. Цуканов В.В., Селиверстова Е.В., Догадин С.А. Показатели липидного состава сыворотки крови и желчи при заболеваниях желчевыводящих путей у больных сахарным диабетом. *Терапевтический архив*. 2005. Т. 77, № 2. С. 15–18. [Tsukanov V.V., Seliverstova E.V., Dogadin S.A. Lipid composition of blood serum and bile in biliary diseases in patients with diabetes mellitus. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2005, vol. 77, no. 2, pp. 15–18. (In Russ.)]
3. Цуканов В.В., Тонких Ю.Л., Бронникова Е.П., Манчук В.Т. Механизм нормолипидемии у северных народностей. *Клиническая медицина*. 1999. Т. 77, № 2. С. 38–39. [Tsukanov V.V., Tonkikh J.L., Bronnikova E.P., Manchuk V.T. The mechanism of normolipidemia among the Northern area ethnic groups. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 1999, vol. 77, no. 2, pp. 38–39. (In Russ.)]
4. Цуканов В.В., Тонких Ю.Л., Гилюк А.В., Васютин А.В., Коленчукова О.А., Ржавичева О.С., Борисов А.Г., Савченко А.А., Масленникова Н.А. Диагностика, клиника и лечение описторхоза. *Доктор.Ру*. 2019. № 8 (163). С. 49–53. [Tsukanov V.V.,

- Tonkikh J.L., Gilyuk A.V., Vasyutin A.V., Kolenchukova O.A., Rzhavicheva O.S., Borisov A.G., Savchenko A.A., Maslennikova N.A. Opisthorchiasis: diagnostics, clinical manifestations, and management. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2019, no. 8(163), pp. 49–53. (In Russ.) doi: 10.31550/1727-2378-2019-163-8-49-53
5. Antoniadis C.G., Berry P.A., Wendon J.A., Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J. Hepatol.*, 2008, vol. 49, no. 5, pp. 845–861. doi: 10.1016/j.jhep.2008.08.009
 6. Fedorova O.S., Janse J.J., Ogorodova L.M., Fedotova M.M., Achterberg R.A., Verweij J.J., Fernández-Rivas M., Versteeg S.A., Potts J., Minelli C., van Ree R., Burney P., Yazdanbakhsh M. Opisthorchis felinus negatively associates with skin test reactivity in Russia-EuroPrevall-International Cooperation study. *Allergy*, 2017, vol. 72, no. 7, pp. 1096–1104. doi: 10.1111/all.13120
 7. Fedorova O.S., Kovshirina Y.V., Kovshirina A.E., Fedotova M.M., Deev I.A., Petrovskiy F.I., Filimonov A.V., Dmitrieva A.I., Kudyakov L.A., Saltykova I.V., Odermatt P., Ogorodova L.M. Opisthorchis felinus infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: a review of medical statistics. *Parasitol. Int.*, 2017, vol. 66, no. 4, pp. 365–371. doi: 10.1016/j.parint.2016.07.010
 8. Kubes P., Mehal W.Z. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, 2012, vol. 143, no. 5, pp. 1158–1172. doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.008
 9. Phathamavong O., Ali M., Phengsavanh A., Xaysomphou D., Odajima H., Nishima S., Kuroiwa C. Prevalence and potential risk factors of rhinitis and atopic eczema among schoolchildren in Vientiane capital, Lao PDR: ISAAC questionnaire. *Biosci. Trends.*, 2008, vol. 2, no. 5, pp. 193–199.
 10. Pillay J., Kamp V.M., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.*, 2012, vol. 122, no. 1, pp. 327–336. doi: 10.1172/JCI57990
 11. Poynard T., Bedossa P., Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*, 1997, vol. 349, no. 9055, pp. 825–832. doi: 10.1016/s0140-6736(96)07642-8
 12. Stanghellini V., Chan F.K., Hasler W.L., Malagelada J.R., Suzuki H., Tack J., Talley N.J. Gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*, 2016, vol. 150, no. 6, pp. 1380–1392. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.011
 13. Xu R., Huang H., Zhang Z., Wang F.S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, vol. 11, no. 3, pp. 224–231. doi: 10.1038/cmi.2014.2
 14. Zou Z., Li B., Xu D., Zhang Z., Zhao J.M., Zhou G., Sun Y., Huang L., Fu J., Yang Y., Jin L., Zhang W., Zhao J., Sun Y., Xin S., Wang F.S. Imbalanced intrahepatic cytokine expression of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-10 in patients with acute-on-chronic liver failure associated with hepatitis B virus infection. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2009, vol. 43, no. 2, pp. 182–190. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181624464

Авторы:

Цуканов В.В., д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением патологии пищеварительной системы взрослых и детей НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Горчилова Е.Г., врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения ЧУЗ КБ «РЖД-Медицина» города Красноярск, г. Красноярск, Россия;

Коленчукова О.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Гвоздев И.И., младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Савченко А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Васютин А.В., к.м.н., старший научный сотрудник клинического отделения патологии пищеварительной системы взрослых и детей НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Тонких Ю.Л., к.м.н., ведущий научный сотрудник клинического отделения патологии пищеварительной системы взрослых и детей НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Ржавичева О.С., к.м.н., зав. гастроэнтерологическим отделением ЧУЗ КБ «РЖД-Медицина» города Красноярск, г. Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Tsukanov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Gorchilova E.G., Gastroenterologist, Gastroenterological Department, Private Healthcare Institution Clinical hospital “RZD-Medicine” of Krasnoyarsk City, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Gvozdev I.I., Junior Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Vasyutin A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Tonkikh J.L., PhD (Medicine), Leading Researcher, Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Rzhavicheva O.S., PhD (Medicine), Head of the Gastroenterological Department, Private Healthcare Institution Clinical hospital “RZD-Medicine” of Krasnoyarsk City, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.03.2020
Отправлена на доработку 21.05.2020
Принята к печати 22.05.2020

Received 20.03.2020
Revision received 21.05.2020
Accepted 22.05.2020

СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КОРИ В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ

А.В. Любимова¹, М.Д. Злоказов^{1,2}, Л.А. Иванова², Л.Ю. Арзамасцева³,
Н.Н. Рыжман⁴, Е.Н. Колосовская^{1,4}, О.П. Гумилевская⁴

¹ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, Россия

² ГБУЗ Родильный дом № 10, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУЗ Городская поликлиника № 91, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — оценка напряженности иммунитета к вирусу кори работников медицинских организаций разного профиля, лиц молодого возраста и новорожденных. *Материалы и методы.* Методом ИФА («ВектоКорь-IgG») определен иммунный статус к вирусу кори у основных сотрудников ГБУЗ Родильный дом № 10 (386 человек), лиц гражданского персонала и медицинских сотрудников до 50 лет клиник Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (ВМедА) (1399 человека), курсантов ВМедА (304 человека) и у 34 новорожденных детей. *Результаты.* Выявлен высокий общий уровень защищенности от вируса кори сотрудников медицинских организаций: иммунитет к вирусу серологически подтвердился у 87,5±3,3% сотрудников роддома и 81,6±2,1% сотрудников клиник ВМедА. Различий в иммунном статусе среди медицинского персонала различных категорий и медицинского персонала отделений разного профиля не выявлено. Более низкий популяционный иммунитет наблюдался в возрастной группе 20–40 лет. Среди сотрудников родильного дома удельный вес серопозитивных к вирусу кори среди персонала 20–40 лет составил 75,9% (95% ДИ 67,2–82,9%), 40–59 лет — 91,5% (95% ДИ 86,7–94,7%), лица 60 лет и старше были серопозитивны все (95% ДИ 94,6–100%). Двукратная вакцинация не гарантировала формирования эффективного противокорьевого иммунитета. Большинство серонегативных лиц имели в анамнезе двукратную вакцинацию, поэтому даже при ее наличии необходимо проведение серологического обследования перед приемом на работу в медицинскую организацию. Более 90% сотрудников составляют женщины. Таким образом, женщины фертильного возраста с документальным подтверждением двукратной вакцинации, но серонегативные, подвергаются риску заболевания корью и внутриутробного инфицирования плода, при этом также увеличивается риск заболевания их детей до достижения прививочного возраста. Это подтверждается тем, что только 70,6±15,3% новорожденных детей имели иммунитет к вирусу кори. Доля серонегативных новорожденных (29,4±15,3%) сравнима с долей серонегативного персонала родильного дома в возрасте 20–40 лет (24,1±8,1%). В более молодой возрастной группе (лица в возрасте от 18 до 23 лет) — у курсантов ВМедА — выявлено значительно большее число серонегативных лиц — 48,3±5,6%, что делает высокой вероятность возникновения эпидемической вспышки при заносе кори в подобные коллективы. *Выводы.* Для достижения элиминации кори необходима разработка программы скрининга на наличие антител к этому вирусу у лиц молодого и среднего возраста.

Ключевые слова: корь, иммунитет, медицинские работники, новорожденные дети, вакцинация, профилактика.

Адрес для переписки:

Любимова Анна Викторовна
191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41,
ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (906) 244-83-22.
E-mail: lubimova@gmail.com

Contacts:

Anna V. Liubimova
191015, Russian Federation, St. Petersburg, Kirochnaya str., 41,
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov.
Phone: +7 (906) 244-83-22.
E-mail: lubimova@gmail.com

Для цитирования:

Любимова А.В., Злоказов М.Д., Иванова Л.А., Арзамасцева Л.Ю.,
Рыжман Н.Н., Колосовская Е.Н., Гумилевская О.П. Состояние
иммунитета к вирусу кори в различных группах населения // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 577–584. doi: 10.15789/2220-7619-
ITM-1139

Citation:

Liubimova A.V., Zlokazov M.D., Ivanova L.A., Arzamastseva L.Yu.,
Ryzhman N.N., Kolosovskaya E.N., Gumilevskaya O.P. Immunity to measles
virus in diverse population groups // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 577–584.
doi: 10.15789/2220-7619-ITM-1139

IMMUNITY TO MEASLES VIRUS IN DIVERSE POPULATION GROUPS

Liubimova A.V.^a, Zlokazov M.D.^{a,b}, Ivanova L.A.^b, Arzamastseva L.Yu.^c, Ryzhman N.N.^d, Kolosovskaya E.N.^{a,d}, Gumilevskaya O.P.^d

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

^b Maternity Hospital No. 10, St. Petersburg, Russian Federation

^c Municipal Polyclinic No. 91, St. Petersburg, Russian Federation

^d Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to assess the measles immunity level among employees of medical organizations of various specialties, young subjects, and neonates. *Materials and Methods.* The measles immunity status was assessed for all the employees of St. Petersburg State Budgetary Healthcare Institution Maternity Hospital No. 10 (386 subjects), civilian medical staff of the clinics of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov (Military Medical Academy) (1399 subjects), cadets of the Military Medical Academy (304 subjects) and 34 neonates. Laboratory testing was performed by using ELISA with test kits “VektoKor-IgG” (RF). *Results.* Medical workers displayed high total level of protection against measles virus serologically confirmed in 87.5% of the maternity hospital staff and 81.6% of the employees at the Military Medical Academy clinics. No differences in the immune status between the varying categories of medical personnel from the departments of various specialties were revealed. Lower population immunity was observed in the 20–40-year age group. Among the employees of the maternity hospital, the proportion of measles virus seropositive subjects aged 20–40 years was 75.9% (95%, CI 67.2–82.9%), 40–59 years — 91.5% (95%, CI 86.7–94.7%), 60 year and older subjects were all seropositive (95%, CI 94.6–100%). Dual vaccination did not guarantee emergence of effective measles immunity. The majority of seronegative subjects were dually vaccinated, hence, even in case of previous dual measles vaccination, it is necessary to perform a serological examination prior to recruitment to medical facilities. Females comprised more than 90% of medical workers. Therefore, women of fertile age previously dually vaccinated, but immunologically seronegative, are at risk of measles and intrauterine fetal infection, as well as the risk of its development is increased in vaccination age children. It was confirmed by demonstrating that as few as $70.6 \pm 15.3\%$ of neonates were immune to the measles virus. The proportion of seronegative infants ($29.4 \pm 15.3\%$) was comparable to that one in seronegative subjects aged 20–40 years ($24.1 \pm 8.1\%$) working at the maternity hospital. Among the younger age group (aged 18–23 years) such as cadets of the Military Medical Academy, a significantly higher proportion of seronegative individuals was found — $48.3 \pm 5.6\%$, thereby increasing probability for measles outbreak therein. *Conclusions.* In order to eradicate measles, it is necessary to develop a screening program for detecting antibodies against measles among young and middle-aged subjects.

Key words: measles, immunity, health-care workers, newborn children, vaccination, prevention.

Введение

По данным федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ситуация по кори в мире, в том числе в странах Европы, уже третий год остается неблагоприятной [3]. Основной причиной этого является снижение охватом плановой иммунизации против кори детей и взрослых, рост числа отказов от прививок.

Особого внимания требует мониторинг иммунного статуса к вирусу кори медицинских работников. По данным систематического обзора, риск заражения медицинского персонала корью в 2–19 раз выше, чем населения в целом. Filia A. и соавт. показали, что чаще заболевают медработники, у которых отсутствует специфический иммунитет к кори или иммунный статус не известен [6]. Результаты серологического исследования показали, что от 3,3 до 14% медицинских работников не имели противокоревых антител, в том числе лица, считавшие, что они ранее перенесли данное заболевание. В 15 из 30 стран Европы отсутствовали рекомендации и нормативные документы, обязывающие про-

водить вакцинацию против кори медицинского персонала. Недостоверная информация в документации о двукратной иммунизации против кори или другие ложные свидетельства о наличии иммунитета (сведения о перенесенном ранее заболевании, сведения о наличии защитных титров антител против кори) среди медицинского персонала приводили к росту заболеваемости в случае заноса кори в стационар [5, 6].

В случае заноса кори в акушерский стационар риск инфицирования новорожденных детей корью напрямую зависит от напряженности иммунитета матери, следовательно, необходим особый контроль за этой группой населения. Следует отметить, что специфического этиотропного лечения кори на данный момент не существует, а введение противокорьевого иммуноглобулина после родов в некоторых случаях лишь смягчает течение заболевания.

Не менее существенным является уровень защищенности от вируса кори медицинского персонала медицинских организаций других профилей. Так, согласно п. 1.6. Постановления Главного государственного санитарного врача по городу Санкт-Петербургу от 19.06.2018 № 5

«Об усилении мер профилактики кори в Санкт-Петербурге», требуется провести отбор лиц с целью проведения экстренной вакцинации против кори для обеспечения иммунной прослойки в коллективе медицинского учреждения не менее 90%. Цель данного исследования — оценка напряженности иммунитета к вирусу кори работников медицинских организаций разного профиля, лиц молодого возраста и новорожденных.

Материалы и методы

В июне 2018 г. проведено серологическое обследование 1399 человек из числа гражданского персонала клиник и клинических подразделений ВМедА, а также 302 курсантов ВМедА. В период с 01.08.18 по 31.10.18 проводилась оценка напряженности иммунитета к вирусу кори у всех основных сотрудников ГБУЗ Родильный дом № 10 (386 человек). Также с 13.09.18 по 16.09.18 был определен иммунный статус 34 новорожденных детей. Серологические исследования образцов цельной венозной крови сотрудников и пуповинной крови новорожденных проводились на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Лазурит» методом ИФА с использованием наборов «ВектоКорь-IgG» (Вектор-Бест, Россия). Были проанализирована напряженность иммунитета к вирусу кори на основании данных 2012 г. (70 сотрудников).

Положительным результатом серологического исследования считались значения $> 0,18$ МЕ/мл, сомнительным результатом — $0,12-0,18$ МЕ/мл и отрицательным результатом $< 0,12$ МЕ/мл.

Результаты и обсуждение

Несмотря на то что глобальном стратегическом плане борьбы с корью на 2012–2020 г. поставлена задача ликвидировать эту инфекцию к концу 2020 г., по меньшей мере в 5 регионах мира заболеваемость корью остается на значительном уровне. Многолетняя динамика заболеваемости корью в Европейском регионе характеризуется ее ростом за последние 10 лет более чем в 6 раз (рис. 1).

Неблагополучие по кори в Европейском регионе создает дополнительные риски осложнения эпидемиологической ситуации в нашей стране [3].

В Российской Федерации (РФ) пик заболеваемости корью приходился на 2013–2014 гг. — 3,28 на 100 тыс. населения (рис. 2).

В РФ за последние 6 месяцев 2018 г. заболеваемость корью возросла в 13,5 раз по сравнению с 2017 г. В Санкт-Петербурге наблюдается схожая динамика. Основной причиной роста заболеваемости является отсутствие специфического иммунитета. В Санкт-Петербурге доля серонегативных лиц в 2017 г. составила 8,6% [3]. Отсутствие специфического иммунитета у персонала и пациентов медицинских организаций может привести не только к единичным случаям заболевания, но и к внутрибольничным вспышкам.

Сотрудники родильного дома. Из 386 обследованных работников ГБУЗ Родильный дом № 10 иммунитет к кори серологически подтвердился у 338 (87,5%). Не было выявлено статистически значимых различий иммунного статуса как

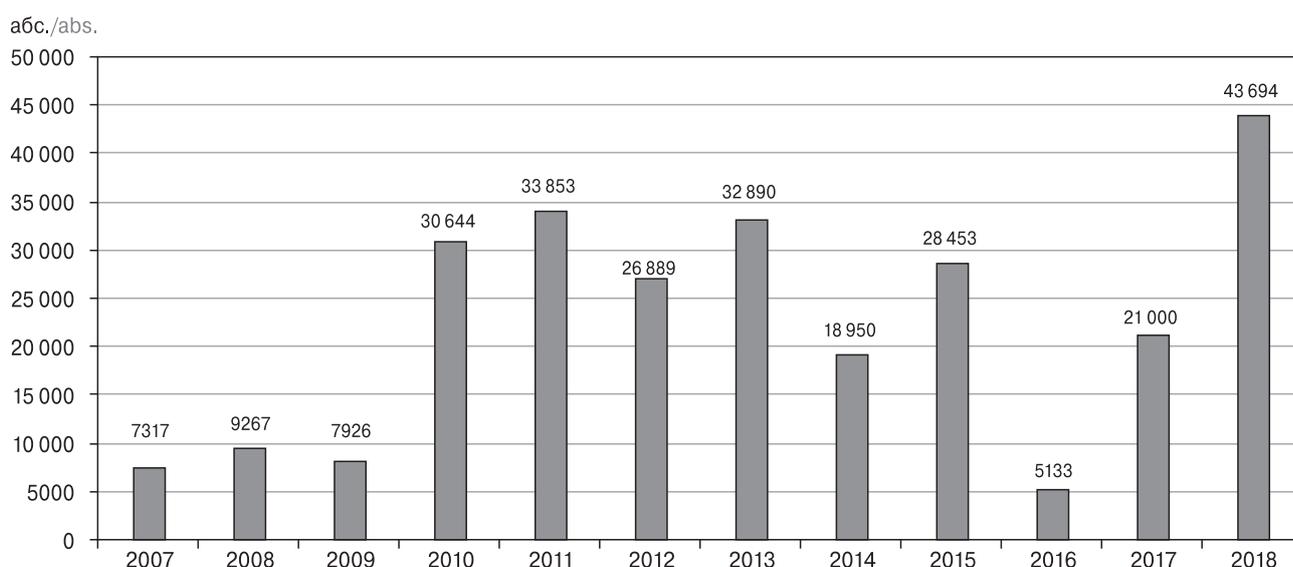


Рисунок 1. Многолетняя динамика заболеваемости корью в Европейском регионе с 2007 г. по 7-й месяц 2018 г.

Figure 1. Measles case distribution in the European region from 2007 to 7 months of 2018



Рисунок 2. Многолетняя динамика заболеваемости корью в Российской Федерации и в Санкт-Петербурге с 2005 г. по 6-й месяц 2018 г.

Figure 2. Measles annual incidence in the Russian Federation and in St. Petersburg from 2005 to 6 months of 2018 per 100,000 population

между медицинским и немедицинским персоналом, так и среди различных групп медицинских работников (табл. 1).

Младший медицинский персонал оказался наиболее защищенным от кори, что, вероятно, связано с наличием приобретенного естественного иммунитета — 56% лиц, входивших в данную группу, были старше 50 лет. Наибольшая доля серонегативных лиц отмечается в группе среднего медицинского персонала, 74% серонегативных лиц из этой группы составляют женщины до 40 лет. Отсутствие антител к кори было напрямую связано с возрастом обследуемых. Из всего персонала в группе риска от-

сутствия специфических коревых антител (менее 0,18 МЕ/мл) находились лица в возрасте до 50 лет (OR = 4,61 [95%, ДИ 2,16–11,37]).

Выявлено, что удельный вес серопозитивных к вирусу кори среди персонала 20–40 лет составил 75,9% (95%, ДИ 67,2–82,9%), 40–59 лет — 91,5% (95%, ДИ 86,7–94,7%), лица 60 лет и старше были все серопозитивны (95%, ДИ 94,6–100%). Удельный вес возрастал с увеличением возраста серонегативных сотрудников (рис. 3). Аналогичные данные получены в феврале 2012 г. на фоне вспышки кори в Санкт-Петербурге при выборочном обследовании 100 медицинских работников поликлиник [2].

Таблица 1. Результаты серологических обследований сотрудников ГБУЗ Родильный дом № 10

Table 1. The results of serological observation of the staff of Maternity Hospital No. 10

Группы наблюдения Monitoring groups	Всего Total	Положительный результат (> 0,18 МЕ/мл) Positive result (> 0.18 UI/ml)	Сомнительный результат (0,12–0,18 МЕ/мл) Doubtful result (0.12–0.18 UI/ml)	Отрицательный результат (< 0,12 МЕ/мл) Negative result (< 0.12 UI/ml)
Весь персонал All staff	386	338 (87,5±3,3%)	18 (4,7±2,1%)	30 (7,8±2,6%)
Немедицинский персонал Non-medical staff	80	68 (85±7,8%)	4 (5±4,8%)	8 (10±6,6%)
Медицинский персонал, в том числе Medical staff, including	306	270 (88,2±3,6%)	14 (4,6±2,4%)	22 (7,2±2,9%)
– врачи – doctors	78	70 (89,7±6,7%)	0 (0%)	8 (10,3±6,7%)
– средний медицинский персонал – nursing staff	158	135 (85,4±5,5%)	11 (7,0±4%)	12 (7,6±,2%)
– младший медицинский персонал – nursing assistants and cleaners	70	65 (92,8±6%)	3 (4,3±3,9%)	2 (2,9±2%)

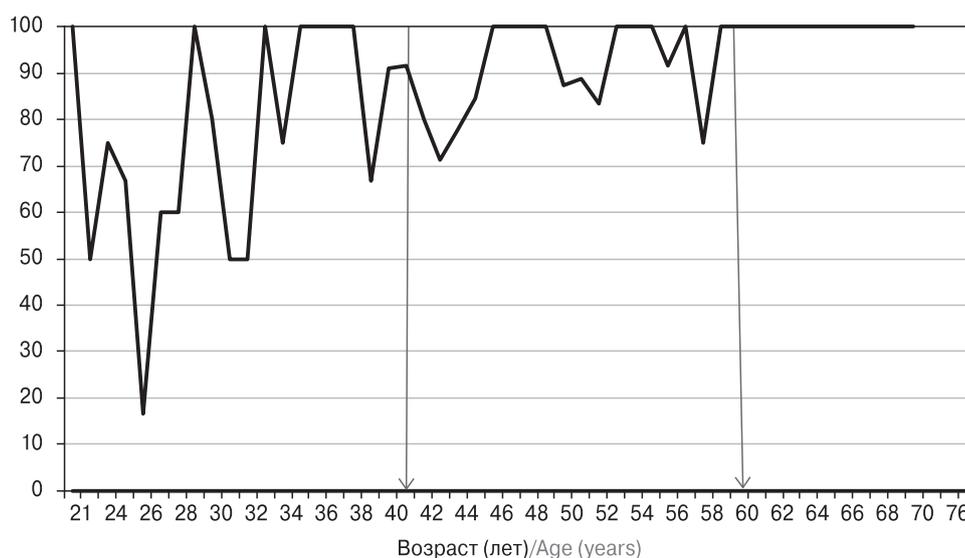


Рисунок 3. Удельный вес серопозитивных к вирусу кори сотрудников в разных возрастных группах
Figure 3. The proportion of seropositive staff to the measles virus in different age groups

Следует учесть, что подавляющее большинство всех сотрудников составляют женщины (91%). Наибольшая доля серонегативных отмечается среди женщин фертильного возраста, и этот факт, особенно если экстраполировать эти данные на все население, является крайне неблагоприятным, так как отсутствие иммунитета против кори является риском заболевания не только для женщины, но также и для плода в случае заболевания во время беременности.

Среди 386 обследованных сотрудников родильного дома 257 (66,6%) были привиты двукратно, 27 (7%) — однократно, 102 (26,4%) указывали, что болели корью либо ранее имели защитные титры антител к кори. При этом наибольшая частота отрицательных и сомнительных результатов отмечалась в группе лиц, имевших документальное подтверждение вакцинации (табл. 2).

Таким образом, двукратная вакцинация не гарантирует наличие эффективного противокорьевого иммунитета. Аналогичные данные

были получены Долбиным Д.А. и соавт.: в 2012 г. при выборочном обследовании медицинского персонала поликлиники Санкт-Петербурга только 65% привитых двукратно имели высокий титр противокоревых антител [2].

Группой риска наличия сомнительного результата серологического обследования среди привитых двукратно явились сотрудники в возрасте 20–29 лет (рис. 4).

При сравнении титров антител у 70 сотрудников, прошедших серологическое исследование в 2012 г., с результатами настоящего исследования выявлено, что у 11 из них наблюдалось снижение титра антител ($15,7 \pm 8,5\%$) в среднем на 0,07 МЕ/мл (ДИ 0,1–0,24), медианное значение составило 0,18 МЕ/мл (ДИ 0,01–0,35). Эти данные послужили обоснованием включения лиц с титрами от 0,18 до 0,4 МЕ/мл в контингент, подлежащий вакцинации против кори, так как за последующие 5 лет напряженность их иммунитета может упасть до пороговых значений.

Таблица 2. Прививочный анамнез лиц с отрицательным и сомнительным результатом обследования
Table 2. Vaccination history of persons with negative and doubtful examination results

Прививочный анамнез Vaccination history	Отрицательный результат ($< 0,12$ МЕ/мл) Negative result (< 0.12 UI/ml)	Сомнительный результат ($0,12-0,18$ МЕ/мл) Doubtful result ($0.12-0.18$ UI/ml)	Всего Total
Привиты двукратно Double vaccinated	23 (76,7 \pm 15,1%)	15 (83,3 \pm 17,2%)	38 (79,2 \pm 11,5%)
Привиты однократно Single vaccinated	3 (10 \pm 10%)	2 (11,1 \pm 11,4%)	5 (10,4 \pm 8,6%)
«Со слов» имеют иммунитет Have immunity in their own opinion	4 (13,3 \pm 1,2%)	1 (5,6 \pm 6%)	5 (10,4 \pm 8,6%)
Всего Total	30 (100%)	18 (100%)	48 (100%)

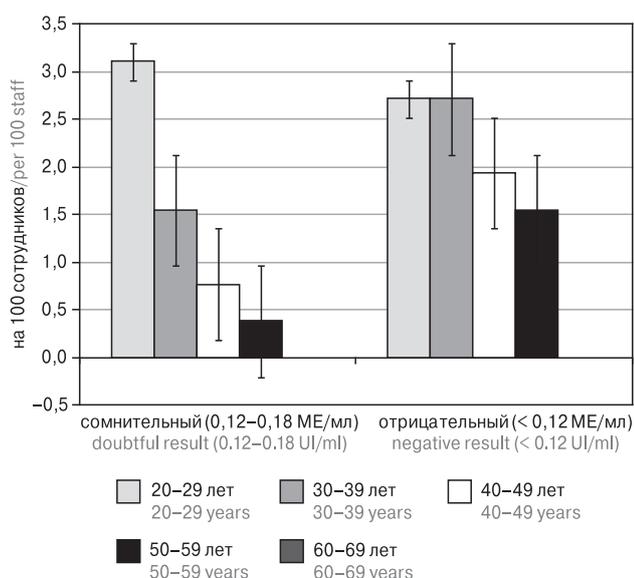


Рисунок 4. Удельный вес отрицательных и сомнительных результатов серологического обследования среди лиц, привитых против кори двукратно, в разных возрастных группах

Figure 4. The proportion of negative and doubtful results of a serological observation of the staff in different age groups who was double vaccinated

Данные об иммунологической защищенности сотрудников родильного дома были сопоставлены с данными иммунного статуса сотрудников клиник Военно-медицинской академии.

Сотрудники клиник Военно-медицинской академии. С учетом очень высокого уровня заболеваемости корью в допрививочный период (до 1969 г. показатель заболеваемости составлял 1200 на 100 000 населения), количество лиц,

нуждающихся в серологическом обследовании из числа сотрудников клиник и клинических подразделений, было уменьшено с учетом возраста за счет исключения из исследования лиц, родившихся до 1970 г. Результаты иммунологического обследования на наличие антител к вирусу кори у сотрудников клиник Военно-медицинской академии из числа гражданского персонала представлены в табл. 3.

Уровень иммунологической защищенности у сотрудников клиник Военно-медицинской академии в возрасте до 50 лет был сравним с уровнем иммунологической защищенности у сотрудников родильного дома той же возрастной категории — 81,6 и 83,1% соответственно.

Среди 1392 обследованных лиц из числа гражданского медицинского персонала клиник и клинических подразделений отрицательные результаты выявлены у 152 человек (10,9%), сомнительные — у 105 человек (7,5%), причем разница этих показателей между сотрудниками различных медицинских категорий (врачи, средний медицинский персонал, младший медицинский персонал) отсутствует. Доля серонегативных лиц среди врачей составила 12,8%, среди среднего медицинского персонала — 15,7%, среди младшего медицинского персонала — 10,6%. Среди лиц, имевших документальное подтверждение двух- или однократно проведенной вакцинации, доля серопозитивных составила только половину — 58%.

Таким образом, защищенность от вируса кори персонала различных медицинских организаций не зависит от профиля организации и может быть экстраполирована на население Санкт-Петербурга в целом.

Таблица 3. Результаты серологических обследований сотрудников клиник Военно-медицинской академии

Table 3. The results of serological observation of the staff of clinics of Military Medical Academy named after S.M. Kirov

Группы наблюдения Monitoring groups	Всего Total	Положительный результат (> 0,18 МЕ/мл) Positive result (> 0.18 UI/ml)	Сомнительный результат (0,12–0,18 МЕ/мл) Doubtful result (0.12–0.18 UI/ml)	Отрицательный результат (< 0,12 МЕ/мл) Negative result (< 0.12 UI/ml)
Весь персонал All staff	1399	1142 (81,6±2,1%)	105 (7,5±1,4%)	152 (10,9±1,6%)
Немедицинский персонал Non-medical staff	7	7 (100%)	0	0
Медицинский персонал, в том числе Medical staff, including	1392	1135 (81,5±2%)	105 (7,5±1,4%)	152 (10,9±1,6%)
– врачи – doctors	455	373 (81,9±3,5%)	34 (7,4±2,4%)	48 (10,5±2,8%)
– средний медицинский персонал – nursing staff	575	452 (78,6±3,3%)	52 (9,04±2,3%)	71 (12,3±2,7%)
– младший медицинский персонал – nursing assistants and cleaners	362	310 (85,6±3,6%)	19 (5,2±2,3%)	33 (9,1±3%)

Курсанты. В то же время в более молодой возрастной группе (лица в возрасте от 18 до 23 лет) — у курсантов Военно-медицинской академии — выявлена значительно более существенная доля серонегативных лиц. Так, из 304 обследованных курсантов у 113 человек выявлены отрицательные результаты (37,7±5,4%), у 44 — сомнительные (14,5±4%). Уровень иммунологической защищенности от вируса кори составил 48,3% и был сравним с таковым у персонала родильного дома того же возраста — 60%.

Новорожденные дети. Из 34 новорожденных детей, вошедших в исследование, у 7 детей (20,6±13,6%) был получен отрицательный результат серологического исследования на наличие антител против кори. У 3 детей (8,8±8,8%) значение титров попадало в «сомнительный» диапазон. Для сравнения: результаты обследования 226 новорожденных в Москве показали, что доля серопозитивных к вирусу кори в этой группе составила 78,3±2,7% [6]. Удельный вес серонегативных новорожденных (29,4±15,3%) сравним с долей серонегативного персонала родильного дома в возрасте 20–40 лет (24,1±8,1%). Высокий удельный вес серонегативных среди лиц фертильного возраста увеличивает риск как заражения корью беременных, так и заболевания корью новорожденных и детей до года. Уже описаны случаи кори у новорожденных детей в Белоруссии [1], в Италии с января по август 2017 г. корью заболел 541 ребенок до года, и в этой возрастной группе наблюдалась самая высокая заболеваемость [7]. В исследовании, проведенном в Испании, выявлено, что за 10 лет (2003–2013 гг.) доля серопозитивных к кори новорожденных снизилась на 7% [9]; в заключение систематического обзора, посвященного изучению пассивного им-

мунитета новорожденных к кори, отмечается, что в условиях, которые привели к ликвидации кори, некоторые дети оказались восприимчивы к вирусу задолго до возраста обычной иммунизации против данного заболевания [8].

Таким образом, необходима разработка программы скрининга женщин детородного возраста на наличие антител к вирусу кори.

Заключение

Выявлен высокий общий уровень защищенности от вируса кори сотрудников медицинских организаций, однако наблюдается выраженная тенденция ее снижения у сотрудников до 40 лет. Большинство серонегативных лиц имели в анамнезе двукратную вакцинацию, поэтому даже при наличии двукратной вакцинации против кори в анамнезе необходимо проведение серологического обследования перед приемом на работу в медицинскую организацию.

Более 90% сотрудников составляют женщины. Таким образом, женщины фертильного возраста, привитые двукратно, как следует из документов, но иммунологически серонегативные, подвергаются риску заболевания корью и внутриутробного инфицирования плода, при этом также увеличивается риск заболевания их детей до достижения прививочного возраста. Мы рекомендуем разработать программу профилактики кори у женщин детородного возраста на основе массового скрининга на наличие противокорьевого иммунитета и вакцинации восприимчивых женщин.

Также нуждаются в серологическом скрининге лица, поступающие в высшие учебные учреждения.

Список литературы/References

1. Астапов А.А., Мельникова В.Н., Свирчевская Е.Ю. Корь у новорожденного ребенка // Здравоохранение. 2013. № 2. С. 62–63. [Astapov A.A., Melnikova V.N., Svirchevskaya E.Yu. Newborn's measles. *Zdravookhranenie = Healthcare*, 2013, no. 2, pp. 62–63. (In Russ.)]
2. Долбин Д.А., Хайруллин Р.З. Иммунологическая прослойка к вирусу кори у медицинских работников // Научный альманах. 2015. Т. 9, № 11. С. 954–956. [Dolbin D.A., Khayrullin R.Z. Immunological layer of measles virus in health care workers. *Nauchny almanakh = Science Almanac*, 2015, vol. 9, no. 11, pp. 954–956. (In Russ.)] doi: 10.17117/na.2015.09.954
3. Об эпидемической ситуации по кори. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 23.08.2018. [On the epidemic situation for measles. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being. 23.08.2018. (In Russ.)] URL: http://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10555&sphrase_id=1479622
4. Тихонова Н.Т., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Басов А.А., Фролов Р.А., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Ватолина А.А., Иванников Н.Ю., Мельник Т.Н., Захарян А.И. Состояние специфического иммунитета к вирусам кори и краснухи у новорожденных и их матерей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 6. С. 14–20. [Tikhonova N.T., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Basov A.A., Frolov R.A., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Vatolina A.A., Ivannikov N.Yu., Melnik T.N., Zakharyan A.I. The State of specific immunity to measles and rubella virus in newborns and their mothers. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2018, vol. 99, no. 1, pp. 148–150. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-14-20
5. Fiebelkorn A.P., Seward J.F., Orenstein W.A. A global perspective of vaccination of healthcare personnel against measles: systematic review. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 38, pp. 4823–4839. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.005
6. 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? *EuroSurveill*, 2017, vol. 22, no. 37: 30614. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.37.30614

7. Guerra F.M., Crowcroft N.S., Friedman L., Deeks S.L., Halperin S.A., Severini A., Hatchette T.F., Bolotin S.; Immunity of Canadians and Risk of Epidemics (iCARE) Network. Waning of measles maternal antibody in infants in measles elimination settings — a systematic literature review. *Vaccine*, 2018, vol. 36, no. 10, pp. 1248–1255. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.01.002
8. Coughlin M.M., Beck A.S., Bankamp B., Rota P.A. Perspective on global measles epidemiology and control and the role of novel vaccination strategies. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 1: 11. doi: 10.3390/v9010011
9. Plans P., de Ory F., Campins M., Álvarez E., Payà T., Guisasola E., Compte C., Vellbè K., Sánchez C., Lozano M.J., Aran I., Bonmatí A., Carreras R., Jané M., Cabero L. Prevalence of anti-rubella, anti-measles and anti-mumps IgG antibodies in neonates and pregnant women in Catalonia (Spain) in 2013: susceptibility to measles increased from 2003 to 2013. *Eur J Clin. Microbiol. Infect Dis*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 1161–1171. doi: 10.1007/s10096-015-2339-4

Авторы:

Любимова А.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;
Злоказов М.Д., аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;
Иванова Л.А., к.м.н., главный врач ГБУЗ Родильный дом № 10, Санкт-Петербург, Россия;
Арзамасцева Л.Ю., врач-эпидемиолог ГБУЗ Городская поликлиника № 91, Санкт-Петербург, Россия;
Рыжман Н.Н., к.м.н., зам. начальника академии по клинической работе ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;
Колосовская Е.Н., д.м.н., зав. отделом санитарно-эпидемиологического надзора за госпитальной инфекцией ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;
Гумилевская О.П., д.м.н., начальник центра клинической лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Liubimova A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Desinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Zlokazov M.D., PhD Student of the Department of Epidemiology, Parasitology and Desinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Ivanova L.A., PhD (Medicine), Head Physician of the Maternity Hospital No. 10, St. Petersburg, Russian Federation;
Arzamastseva L.Yu., Epidemiologist, Municipal Polyclinic No. 91, St. Petersburg, Russian Federation;
Ryzhman N.N., PhD (Medicine), Deputy Head of the Clinical Research Academy, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;
Kolosovskaya E.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Sanitary and Epidemiological Surveillance for Hospital Infection, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Desinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Gumilevskaya O.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Clinical Laboratory Diagnostics Centre, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.01.2019
 Отправлена на доработку 30.05.2019
 Принята к печати 11.05.2020

Received 23.01.2019
 Revision received 30.05.2019
 Accepted 11.05.2020

ОЦЕНКА ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА СЕРРАЦИЙ ИЗ КРИОГЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЙ

А.Е. Гончаров^{1,3,4}, А.П. Соломенный², А.Л. Панин^{5,6}, С.Е. Григорьев⁷,
М.Ю. Чепрасов⁷, Я.А. Ахременко⁷, В.В. Колоджиева³, Н.Е. Гончаров^{3,5},
Л.А. Краева^{5,8}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

⁶ ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства, Санкт-Петербург, Россия

⁷ ФГАОУ ВО Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия

⁸ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Условно-патогенные бактерии рода *Serratia* широко распространены в природе, однако данный род также включает в себя виды, связанные со вспышками внутрибольничных инфекций. Серрации обнаруживаются в экстремальных местообитаниях, однако патогенный потенциал полиэкстремофильных представителей рода *Serratia* практически не изучен. Задачей настоящего исследования являлся сравнительный анализ геномов двух штаммов серраций из полярных регионов, сфокусированный на изучении генетических факторов вирулентности и адаптации к криогенным условиям существования. Штамм *Serratia liquefaciens* 72 выделен в ходе 56-й Российской Антарктической экспедиции из образца гуано колонии пингвинов Адели (*Pygoscelis adeliae*) на острове Токарева (архипелаг Хасуэлл, Восточная Антарктида). Штамм *Serratia fonticola* 51 выделен при микробиологическом исследовании материала ископаемого лося (*Alces alces*), мерзлая туша которого обнаружена на полуострове Буор-Хая вблизи побережья моря Лаптевых (Республика Саха (Якутия), РФ). Проведенное полногеномное секвенирование позволило выявить в геномах изучаемых штаммов структуры, свидетельствующие об их успешной адаптации к низким температурам. Установлено, что в обоих геномах присутствуют гены, кодирующие основные белки-шапероны холодового шока, филогенетически близкие соответствующим генам гипобаротолерантного штамма *Serratia liquefaciens* ATCC 27592. Кроме того, оба штамма имеют кластеры генов *tfABCD*, определяющих способность к адгезии бактериальных клеток к эпителиальным тканям, и генами RTX-токсинов — адгезинов, продукты которых являются важнейшими факторами биопленкообразования у патогенных грамотрицательных бактерий. Экспериментальные исследования под-

Адрес для переписки:

Гончаров Артемий Евгеньевич
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-05-42.
E-mail: phage1@yandex.ru

Contacts:

Artemiy E. Goncharov
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academic Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-05-42.
E-mail: phage1@yandex.ru

Для цитирования:

Гончаров А.Е., Соломенный А.П., Панин А.Л., Григорьев С.Е.,
Чепрасов М.Ю., Ахременко Я.А., Колоджиева В.В., Гончаров Н.Е.,
Краева Л.А. Оценка патогенного потенциала серраций из криогенных
местообитаний // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 585–590.
doi: 10.15789/2220-7619-ASS-1593

Citation:

Goncharov A.E., Solomenny A.P., Panin A.L., Grigorjev S.E., Cheprasov M.Yu.,
Akhremenko Ya.A., Kolodzhieva V.V., Goncharov N.E., Kraeva L.A. Assessing
Serratia spp. pathogenic potential from cryogenic habitats // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3,
pp. 585–590. doi: 10.15789/2220-7619-ASS-1593

Исследование выполнено в рамках тем государственного задания: НИОКТР АААА-А18-118052990083-4; НИОКТР АААА-А19-119112290008-4.

твердили способность *Serratia liquefaciens* 72 и *Serratia fonticola* 51 к активному биопленкообразованию в широком диапазоне температур (от 6° до 37°C). Полученные результаты свидетельствуют о том, что изученные представители рода *Serratia*, выделенные в Арктике и Антарктике, в целом обладают сходными чертами адаптации к условиям полярного климата, включая способность к продукции фимбрий, активной адгезии и биопленкообразованию при низких температурах. Выявленные генетические факторы адаптации могут также выполнять функции факторов патогенности, что позволяет экстремотолерантным штаммам серраций проявлять черты возбудителей оппортунистических и нозокомиальных инфекций, а также передаваться с охлажденными продуктами питания. Широкое применение пищевых технологий, включающих охлаждение и вакуумирование пищевой продукции, потенциально способно создать новую экологическую нишу, благоприятную для селекции психро- и гипобаротолерантных возбудителей пищевых токсикоинфекций. Полученные результаты позволяют поставить вопрос о необходимости дальнейших исследований по мониторингу генетического разнообразия популяций психрофильных гипобаротолерантных микроорганизмов, обладающих патогенным и эпидемическим потенциалом.

Ключевые слова: серрации, биопленки, экстремальные местообитания, психротолерантные бактерии, холодовые адаптации, вирулентность, микробиологический мониторинг.

ASSESSING *SERRATIA* spp. PATHOGENIC POTENTIAL FROM CRYOGENIC HABITATS

Goncharov A.E.^{a,c,d}, Solomenny A.P.^b, Panin A.L.^{e,f}, Grigorjev S.E.^g, Cheprasov M.Yu.^g, Akhremenko Ya.A.^g, Kolodzhieva V.V.^c, Goncharov N.E.^{c,e}, Kraeva L.A.^{e,h}

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

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences Ural Branch, Perm, Russian Federation

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

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

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

^f All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science, St. Petersburg, Russian Federation

^g M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

^h Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The genus *Serratia* are opportunistic bacteria widely spread in natural environment. At the same time, this bacterial genus consists of the species associated with outbreaks of nosocomial infections. *Serratia* species are found in extreme habitats, but pathogenic potential of polyextremophilic strains in this genus remains unexplored. The aim of this study was to compare the genomes of two *Serratia* strains isolated in polar regions, primarily examining genetic factors of virulence and adaptation to cryogenic environment. During the 56th Russian Antarctic Expedition the *Serratia liquefaciens* 72 strain was isolated from a guano sample of the Adelie Penguin (*Pygoscelis adeliae*) colony on Tokarev Island (Haswell Archipelago, East Antarctica). The *Serratia fonticola* 51 strain was isolated from the frozen carcass of moose (*Alces alces*) fossils found on the Buor-Khaya Peninsula near the Laptev Sea coast (Yakutia Region, Russia). The whole-genome sequencing of such strains allowed to reveal genetic structures evidencing about their successful adaptation to low temperatures. Thus, it was found that both genomes contain genes encoding the main cold shock proteins, phylogenetically close to the corresponding genes in the hypobarotolerant *Serratia liquefaciens* strain ATCC 27592. Furthermore, both strains bear a cluster of *tefABCD* genes determining the bacterial adhesion to epithelial tissues, and the genes for RTX toxins — adhesins, crucial factors of biofilm formation in pathogenic Gram-negative bacteria. Experimental studies confirmed the ability of *Serratia liquefaciens* 72 and *Serratia fonticola* 51 to actively form biofilms in a wide temperature range (from 6°C to 37°C). The results obtained indicate that the examined genus *Serratia* strains isolated in Arctica and Antarctica exert overall similar adaptation strategies to polar climate, including the ability to produce pili, show active adhesion, and biofilm formation under low temperatures. Genetic adaptive factors may also act as pathogenicity factors allowing extremotolerant *Serratia* strains to exert traits of opportunistic and nosocomial pathogens and spread via chilled food-borne transmission. The wide use of food technologies, such as cooling and vacuum sealing, can potentially create a new ecological niche favourable for selection of psychrotolerant and hypobarotolerant pathogens. The data obtained allow to raise a question about necessity of further studies to monitor genetic diversity among psychrophilic hypobarotolerant microbial populations possessing pathogenic and epidemic potential.

Key words: *Serratia*, biofilms, extreme environment, psychrotolerant bacteria, cold adaptation, virulence, microbiological monitoring.

Введение

К числу возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, способных вызывать внутрибольничные вспышки, относятся серрации, в частности *Serratia marcescens* [7]. Данные бактерии обуславливают не менее 2% всех инфекций, являясь частой причиной инфекций кровотока, менингитов, эндокардитов, инфекций мочевыводящих путей у иммунокомпрометированных лиц и новорожденных [14]. В то же время представители рода *Serratia* известны как естественные обитатели воды и почвы, среди них имеются также обитатели ризосферы (*S. marcescens*, *S. plymuthica*) симбионты беспозвоночных (*S. nematodiphila*, *S. symbiotica*, *S. proteamaculans*), энтомопатогены (некоторые штаммы *S. liquefaciens*) и фитопатогены (*S. marcescens*). Разнообразие экологических ниш, занимаемых данной таксономической группой, делает ее уникальной моделью для изучения генетических изменений, происходящих в процессе адаптации убиквитарного микроорганизма к специфическим средам обитания (организму человека и внешней среде медицинских учреждений).

Серрации, как и другие энтеробактерии, выделяют и в природных экстремальных биотопах. В Чилийских Андах, где дневной диапазон температур составляет от 0°C до 30°C, выделена *S. ureilytica*, штамм Lg 5/4, в популяции которой впервые для серраций описаны дормантные клеточные формы [9]. В то же время молекулярно-генетические исследования экстремотолерантных штаммов крайне ограничены [12], их патогенный и эпидемический потенциал неясен.

Материалы и методы

В работе обсуждаются особенности строения и функционирования геномов двух штаммов серраций, выделенных нами в криогенных условиях.

Штамм *Serratia liquefaciens* 72 выделен в 2011 г. в ходе 56-й Российской Антарктической экспедиции из образца гуано колонии пингвинов Адели (*Pygoscelis adeliae*), обнаруженной на острове Токарева (архипелаг Хасуэлл, Восточная Антарктида, 66°51'00.0"S 93°00'00.0"E) [2].

Штамм *Serratia fonticola* 51 выделен в марте 2014 г. при микробиологическом исследовании материала из пищеварительного тракта ископаемого животного — так называемого «Омолойского лося» (*Alces alces*). Данная пале-

онтологическая находка была сделана в 2010 г. оленеводами общины «Омолой» на полуострове Буор-Хая вблизи побережья моря Лаптевых (Республика Саха (Якутия), РФ) в точке с координатами 71°53'57.30"N, 132°36'56.69"E. Благодаря залеганию туши животного в толще многолетней мерзлоты прекрасно сохранились мягкие ткани и внутренние органы.

Датирование радиоуглеродным методом свидетельствует об отнесении ископаемых остатков Омолойского лося к периоду голоценового оптимума (абсолютный возраст находки составил 8,865±40 BP (GrA-52436), калиброванный — 10,010±106 cal BP) [1].

Секвенирование геномов обоих штаммов проведено на приборе Ion Torrent PGM по стандартному протоколу, предлагаемому производителем (Life Technologies, США), до достижения 120-кратного покрытия генома.

В работе также оценивали биопленкообразующую активность штаммов серраций при температуре 6°C, 22°C, 37°C. Для этого на 3 предметных стекла наносили по 2 капли объемом 100 мкл, содержащих 1×10^5 КОЕ/мл штаммов исследуемых бактерий в бульоне Мюллера–Хинтон. Стекла размещали в чашках Петри, создав условия «влажной камеры», при температурах 6°C, 22°C и 37°C на 48 часов. Далее фиксировали образовавшиеся биопленки 4%-ным раствором параформальдегида в течение 20 минут при 4°C, удаляли фиксирующий раствор и наносили по капле красителя DAPI (1:1000), оставляли на 30 минут, смывали физиологическим раствором и проводили микроскопию с помощью люминесцентного микроскопа Axio Scope A1 (Zeiss, Германия) при увеличении в 400 раз. Регистрацию изображений осуществляли с помощью профессиональной стационарной цифровой фотокамеры AxioCam HRc Rev3.

Результаты

Последовательности геномов обоих штаммов депонированы в GenBank (Acc. № NZ_MQRG00000000.1 (*Serratia liquefaciens* 72) и Acc. № MQRH00000000 (*Serratia fonticola* 51).

При проведении сравнительного генетического анализа особый интерес для нас представляли структуры, свидетельствующие об адаптации изучаемых бактерий к экстремальной среде обитания.

Установлено, что в геномах присутствуют гены, кодирующие основные белки-шапероны холодового шока (*cspC*, *cspE*, *cspG* у *S. liquefaciens* 72 и *cspC*, *cspE*, *cspG*, *cspD* у *S. fonticola* 51). Сравнительный анализ с использованием алго-

ритма BLAST показал, что нуклеотидные последовательности данных генов близки (сходство 99,1–100%) соответствующим генам гипобаротолерантного штамма *S. liquefaciens* ATCC 27592 (GenBank Acc. № CP006252), способного поддерживать рост при 0°C в низком (0,7 килопаскаля, кПа) вакууме, в том числе в условиях моделирования атмосферы Марса [11].

Принципиальным отличием геномов изученных психротолерантных серраций от генома штамма ATCC 27592 является наличие у них кластера генов *tfABCD* (Typhi colonizing factor), который генетически родственен оперону *Coo* высокоадаптированной к паразитированию в организме человека энтеротоксигенной *E. coli* [3]. Экспрессия этих генов детерминирует формирование у клеток так называемых cable-like фимбрий, которые способствуют адгезии бактериальных клеток к эпителиальным тканям, в том числе человеческому эпителию [6]. При инвазии *S. liquefaciens* они могут быть ответственны и за процесс гемагглютинации.

Ассоциация генов *tfABCD* у антарктической серрации с геном, кодирующим тирозиную рекомбиназу, и наличие у нее, как и у штамма ATCC 27592, плазмиды (размером 98 877 пар оснований у *S. liquefaciens* 72 и 44 107 пар оснований у ATCC 27592) свидетельствует в пользу возможности горизонтального генетического переноса между серрациями и близкородственными видами бактерий в природной или клинической среде.

Другие гены, кодирующие регуляторы синтеза манноза-чувствительных гемагглютининов – основных факторов патогенности серраций. Они представлены фимбриями первого типа и практически сходных у обоих психротолерантных штаммов *S. liquefaciens*, которые близки генам цитотоксичного клинического изолята HUMV-21 (Acc. № NZ_CP011303.1). При этом сходство нуклеотидных последовательностей достигает 98–99%. Патоадаптивные мутации в генах фимбрий первого типа *fim* у энтеробактерий известны [4], но, безусловно, необходима детализация того, как эти мутации отражаются на адгезивном фенотипе.

Дополнительным фактором, обеспечивающим адаптацию *S. fonticola* 51 к персистенции в условиях низких температур, является наличие гена нуклеации льда (ice-nucleation protein), ассоциированного с мобильным генетическим элементом (транспозоном), фланкированным IS91-подобными последовательностями.

Полиэкстремофильный фенотип изучаемых штаммов серраций в значительной мере определяется также их способностью к био-

пленкообразованию. В составе обоих геномов обнаруживаются гены RTX адгезинов-токсигенов, продукты которых являются важнейшими факторами биопленкообразования у ряда патогенных бактерий, включая *Vibrio cholerae* [13]. В то же время адгезины данного класса являются необходимым элементом выживания в экстремальных условиях у антарктической бактерии *Marinomonas primoryensis*, обеспечивая адгезию к диатомовым водорослям и льду [10].

Изучение продукции биопленок обоими штаммами серраций показало, что и *S. liquefaciens* 72, и *S. fonticola* 51 способны к биопленкообразованию *in vitro* во всех температурных условиях, которые были использованы в настоящем исследовании. Как видно из рисунка (см. III обложку), адгезия жизнеспособных клеток к поверхности тест-объекта активно происходит в том числе и при 6°C.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что представители рода *Serratia*, выделенные в Арктике и Антарктике, в целом обладают сходными чертами адаптации к условиям полярного климата, включая способность к продукции фимбрий, активной адгезии и биопленкообразованию при низких температурах. Выявленные адаптивные характеристики, по-видимому, универсальны, и используются серрациями для освоения экстремальных местообитаний, включая техногенные экосистемы и госпитальную среду.

Человек все чаще будет сталкиваться с различными психротолерантными микроорганизмами при расширении масштабов деятельности в полярных и высокогорных районах. Кроме того, сегодня многие продукты питания поставляются в охлажденном виде и в вакуумной упаковке, что существенно увеличивает сроки хранения и расширяет ассортимент за счет экзотической продукции. Широко пропагандируются методы и аппаратура для вакуумирования продуктов питания в домашних условиях. Однако следует учитывать негативные последствия применения данных пищевых технологий, так как в результате фактически создается новая экологическая ниша, благоприятная для селекции психро- и гипобаротолерантных возбудителей пищевых токсикоинфекций. Роль серраций, в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью, в качестве возбудителей подобных заболеваний обсуждалась ранее [5].

В связи с вышеуказанными обстоятельствами все большую актуальность приобретает такое научное направление, как механомикробиология, изучающая отклик микробной клетки на действие физических сил, влияние физических факторов на адгезию, биопленкообразование и другие определяющие патогенность процессы [8].

Заключение

Изученные экстремотолерантные штаммы серраций обладают патогенным потенциалом, позволяющим им при определенных условиях выступать в качестве возбудителей оппортунистических и нозокомиальных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также, вероятно, успешно сохраняться в охлажденных продуктах питания.

По нашему мнению, в настоящее время требуются мониторинговые исследования,

направленные на изучение биоразнообразия и оценку распространения психрофильных гипобаротолерантных микроорганизмов, обладающих патогенным и эпидемическим потенциалом, в природных и антропогенных экосистемах.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках тем государственного задания:

- НИОКТР АААА-А18-118052990083-4;
- НИОКТР АААА-А19-119112290008-4.

Авторы признательны руководству Российской Антарктической экспедиции за помощь в организации полевого этапа исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Григорьев С.Е., Чепрасов М.Ю., Савинов Г.Н., Тихонов А.Н., Новгородов Г.П., Федоров С.Е., Боескоров Г.Г., Протопопов А.В., Плотников В.В., Боголюбский И.Н., Протодьяконов К.Е., ван дер Плихт Й. Палеонтологические и археозоологические исследования в бассейне р. Яна // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. 2017. Т. 1, № 57. С. 20–35. [Grigorjev S.E., Cheprasov M.Yu., Savinov G.N., Tikhonov A.N., Novgorodov G.P., Fedorov S.E., Boeskorov G.G., Protopopov A.V., Plotnikov V.V., Bogolubsky I.N., Protodiyakonov K.E., Van der Plicht J. Paleontological and archaeozoological researches in the Yana river basin. *Vestnik Severo-Vostochnogo federalnogo universiteta = Bulletin of the North-Eastern Federal University*, 2017, vol. 1, no. 57, pp. 20–35. (In Russ.)]
2. Панин А.Л., Сбойчаков В.Б., Белов А.Б., Краева Л.А., Власов Д.Ю., Гончаров А.Е. Природно-техногенная очаговость инфекционных болезней на территории антарктических поселений // Успехи современной биологии. 2016. Т. 136, № 1. С. 53–67. [Panin A.L., Sboichakov V.B., Belov A.B., Kraeva L.A., Vlasov D.Yu., Goncharov A.E. Natural and technogenic focality of infectious diseases in Antarctic settlements. *Uspekhi sovremennoi biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2016, vol. 136, no. 1, pp. 53–67. (In Russ.)] doi: 10.1134/S2079086416040034
3. Azriel S., Goren A., Shomer I., Aviv G., Rahav G., Gal-Mor O. The Typhi colonization factor (Tcf) is encoded by multiple non-typhoidal Salmonella serovars but exhibits a varying expression profile and interchanging contribution to intestinal colonization. *Virulence*, 2017, vol. 8, no. 8, pp. 1791–1807. doi: 10.1080/21505594.2017.1380766
4. Bateman S.L., Stapleton A.E., Stamm W.E., Hooton T.M., Seed P.C. The type 1 pili regulator gene fimX and pathogenicity island PAI-X as molecular markers of uropathogenic Escherichia coli. *Microbiology*, 2013, vol. 159, pp. 1606–1617. doi: 10.1099/mic.0.066472-0
5. Bhutani N., Muraleedharan C., Talreja D., Rana S.W., Walia S., Kumar A., Walia S.K. Occurrence of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase-producing bacteria on iceberg lettuce retailed for human consumption. *Biomed. Res. Int.*, 2015, vol. 515: 547547. doi: 10.1155/2015/547547
6. Bravo V., Puhar A., Sansonetti P., Parsot C., Toro C.S. Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in Shigella spp. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3: e0121785. doi: 10.1371/journal.pone.0121785
7. Casolari C., Pecorari M., Della Casa E., Cattani S., Venturelli C., Fabio G., Tagliazucchi S., Serpini G.F., Migaldi M., Marchegiano P., Rumpianesi F., Ferrari F. Serratia marcescens in a neonatal intensive care unit: two long-term multiclonal outbreaks in a 10-year observational study. *New Microbiol.*, 2013, vol. 36, no. 4, pp. 373–383.
8. Dufrene Y.F., Persat A. Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, vol. 18, pp. 227–240. doi: 10.1038/s41579-019-0314-2
9. Filippidou S., Junier T., Wunderlin T., Kooli W.M., Palmieri I., Al-Dourobi A., Molina V., Lienhard R., Spangenberg J.E., Johnson Sh.L., Chain P.G., Dorador C., Junier P. Adaptive strategies in a poly-extreme environment: differentiation of vegetative cells in Serratia ureilytica and resistance to extreme conditions. *Front. Microbiol.*, vol. 10: 102. doi: 10.3389/fmicb.2019.00102
10. Guo S., Stevens C.A., Vance T.D.R., Olijve L.L.C., Graham L.A., Campbell R.L., Yazdi S.R., Escobedo C., Bar-Dolev M., Yashunsky V., Braslavsky I., Langelaan D.N., Smith S.P., Allingham J.S., Voets I.K., Davies P.L. Structure of a 1.5-MDa adhesin that binds its Antarctic bacterium to diatoms and ice. *Sci. Adv.*, 2017, vol. 3: e1701440. doi: 10.1126/sciadv.1701440
11. Nicholson W.L., Leonard M.T., Fajardo-Cavazos P., Panayotova N., Farmerie W.G., Triplett E.W., Schuerger A.C. Complete genome sequence of Serratia liquefaciens strain ATCC 27592. *Genome Announc.*, 2013, vol. 1, no. 4: e00548-13. doi: 10.1128/genomeA.00548-13
12. Saralov A.I. Adaptivity of archaeal and bacterial extremophiles. *Microbiology*, 2019, vol. 88, pp. 379–401. doi: 10.1134/S0026261719040106

13. Satchell K.J. Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2011, vol. 65, pp. 71–90. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102943
14. Su L.H., Ou J.T., Leu H.S., Chiang P.-Ch., Chiu Yu.-Pi, Chia J.-H., Kuo A.-J., Chiu Ch.-H., Chu Ch., Wu T.-L., Sun Ch.-F., Riley T.V., Chang B.J.; The Infection Control Group. Extended epidemic of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 10, pp. 4726–4732. doi: 10.1128/jcm.41.10.4726-4732.2003

Авторы:

Гончаров А.Е., д.м.н., доцент, зав. лабораторией функциональной геномики и протеомики микроорганизмов ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Соломенный А.П., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории водной микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;

Панин А.Л., научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства, Санкт-Петербург, Россия;

Григорьев С.Е., к.б.н., зав. лабораторией «Музей мамонта им. П.А. Лазарева» ФГАУ ВО Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия;

Чепрасов М.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории «Музей мамонта им. П.А. Лазарева» ФГАУ ВО Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия;

Ахременко Я.А., к.м.н., доцент кафедры гистологии и микробиологии Медицинского института ФГАУ ВО Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия;

Колодзиева В.В., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Гончаров Н.Е., специалист I категории лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Краева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Goncharov A.E., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Functional Genomics and Proteomics of Microorganisms, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Solomenny A.P., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Water Microbiology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences Ural Branch, Perm, Russian Federation;

Panin A.L., Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute; Senior Researcher of the All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science, St. Petersburg, Russian Federation;

Grigorjev S.E., PhD (Biology), Head of the Laboratory “P.A. Lazarev Mammoth Museum”, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation;

Cheprasov M.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory “P.A. Lazarev Mammoth Museum”, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation;

Akhremenko Ya.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Histology and Microbiology of the Medical Institute, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation;

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

Goncharov N.E., Specialist of the 1st Category, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head Technician of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Kraeva L.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

СПОСОБ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS*

Е.П. Сиволодский^{1,2}, Е.В. Зуева²

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

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

Резюме. Цель исследования — разработка способа идентификации бактерий вида *Acinetobacter nosocomialis* по совокупности фенотипических признаков группы *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) с использованием признака уреазной активности. Объектами исследования были клинические штаммы группы *Ab*, выделенные в 2018–2019 гг. в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург), из них *A. baumannii* — 85, *A. nosocomialis* — 12, *A. pittii* — 10 штаммов. Еще 9 штаммов *A. nosocomialis* были выделены из воды реки Невы и 2 штамма *A. calcoaceticus* — из цианобактеральных матов. Принадлежность штаммов к группе *Ab* устанавливали по совокупности метаболических и физиологических признаков таксономическими тестами для данной группы. Видовая принадлежность всех штаммов была установлена методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. Уреазную активность бактерий определяли микрообъемным методом. Использовали среду с мочевиной следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ — 1,1; KH₂PO₄ — 1,1; NaCl — 5,0; 0,4%-ный водно-щелочной раствор фенолового красного — 5 мл; мочевины — 10,0–15,0; вода дистиллированная — 1 л. Ингредиенты, кроме мочевины, растворяли в дистиллированной воде, разливали во флаконы, стерилизовали 20 мин при 121°C, затем добавляли во флаконы мочевины в расчетном количестве. Среду с мочевиной вносили по 0,1 мл в лунки планшета, затем засеивали по полной петле (диаметром 2 мм) суточной агаровой культуры исследуемых и контрольных штаммов и инкубировали в аэробных условиях при 37°C. Результаты реакции на уреазу быстрой активности учитывали через 3 часа инкубации по изменению исходной окраски среды. Для выявления уреазы слабой активности реакцию учитывали через 7–24 часа. Было установлено, что у бактерий группы *Ab* уреазную активность имели 100% штаммов *A. nosocomialis* и 18,82% штаммов *A. baumannii*. При этом уреазу быстрой активности имели все штаммы *A. nosocomialis* и только один штамм *A. baumannii* (1,17%). Следовательно, уреазу быстрой активности имеет таксономическое значение как маркер бактерий вида *A. nosocomialis*, отличающий этот вид от других видов группы *A. baumannii*. Чувствительность и специфичность указанного способа идентификации бактерий вида *A. nosocomialis* относительно идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии составили 100 и 98,83% ($\chi^2 = 103,2$; $p < 0,0001$).

Ключевые слова: *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter baumannii*, уреазы бактерий, уреазы быстрой активности, утилизация глюкозы.

METHOD FOR PHENOTYPIC IDENTIFICATION OF *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS* BACTERIA

Sivolodskii E.P.^{a,b}, Zueva E.V.^b

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

² St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The study's purpose was the developing of the method for *Acinetobacter nosocomialis* bacteria identification by the totality of phenotypic characteristics of the *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) group based on the urease activity trait.

Адрес для переписки:

Зуева Елена Викторовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (921) 382-50-07.
E-mail: elenazueva9@gmail.com

Contacts:

Elena V. Zueva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14, St. Petersburg
Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 382-50-07.
E-mail: elenazueva9@gmail.com

Для цитирования:

Сиволодский Е.П., Зуева Е.В. Способ фенотипической идентификации
бактерий *Acinetobacter nosocomialis* // Инфекция и иммунитет. 2021.
Т. 11, № 3. С. 591–596. doi: 10.15789/2220-7619-MFP-1422

Citation:

Sivolodskii E.P., Zueva E.V. Method for phenotypic identification
of *Acinetobacter nosocomialis* bacteria // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 591–596.
doi: 10.15789/2220-7619-MFP-1422

The research's objects were clinical strains of the *Ab* group, isolated in 2018–2019 in the bacteriological laboratory of Kirov Military Medical Academy (St. Petersburg), of which were *A. baumannii* ($n = 85$), *A. nosocomialis* ($n = 12$), *A. pittii* ($n = 10$). In addition, 9 strains of *A. nosocomialis* were isolated from water samples from the Neva River and 2 strains of *A. calcoaceticus* from the cyanobacterial mats. The belonging of the strains to *Ab* group was determined by the combination of the metabolic and physiological characteristics of the taxonomic tests for this group. The species identification of the studied strains was determined by the matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The urease activity of bacteria was determined using the microvolume method. We used a medium with urea in the following composition (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 1.1$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.1$; $\text{NaCl} - 5.0$; 40% alkaline solution phenol red — 5 ml; urea — 10–15; distilled water — 1 l. The ingredients, without urea, were dissolved in distilled water, dispensed to vials, sterilized for 20 minutes at 121°C , urea was added in the calculated amount. The medium with urea was added in 0.1 ml to wells of the plate, then inoculated the daily agar culture of the studied and control strains by full loop (2 mm in diameter) and incubated under aerobic conditions at 37°C . The reaction results for a rapid urease activity were determined after 3 hours by a change in the initial color of the medium. The reactions were accounted after 7–24 hours to detect activity urease. It was found that 100% of *A. nosocomialis* strains and 18.82% of *A. baumannii* strains had urease activity. At the same time, high activity urease was found only in one strain of *A. baumannii* (1.17%) and in all strains of *A. nosocomialis*. Therefore, the presence of high urease activity is of taxonomic importance for the species *A. nosocomialis* as the marker of distinguishing this species from other bacteria species of the *Ab* group. The sensitivity and specificity of the identifying *A. nosocomialis* strains by suggested approach compared to the studied strains identification by MALDI-TOF MS were 100 and 98.83% ($\chi^2 = 103.2$; $p < 0.0001$), respectively.

Key words: *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter baumannii*, bacterial urease, rapid activity urease, glucose utilization.

Введение

Ацинетобактеры относятся к приоритетным возбудителям инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также раневых инфекций. Еще в 1991 г. основные возбудители этих инфекций, геновиды 1, 2, 3, 13TU, были объединены в комплекс *Acinetobacter calcoaceticus* — *Acinetobacter baumannii* (комплекс АСВ) ввиду невозможности дифференциации этих видов фенотипическими тестами [6]. Так как бактерии *A. calcoaceticus* очень редко обнаруживаются в клиническом материале, в настоящее время эта группа включает три вида (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) и называется «группа *A. baumannii* (*Ab*)». Выявлением ацинетобактеров группы *A. baumannii* (*Ab*) обычно завершается лабораторная диагностика ацинетобактер-инфекции рутинными фенотипическими тестами. Наиболее точным методом идентификации видов ацинетобактеров группы *Ab* является метод секвенирования участков гена *rpoB* [8, 10]. Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) также обеспечивает достоверную и быструю идентификацию видов этой группы, но требует иногда коррекции протокола исследования для *A. nosocomialis* [5, 9]. В связи с возможностью видового контроля штаммов методом MALDI-TOF MS представляет интерес дальнейший поиск надежных и доступных фенотипических тестов идентификации видов бактерий группы *Ab*. Наше внимание привлек уреазный тест ввиду отсутствия сведений об уреазном признаке в таксономических описаниях видов бактерий комплекса АСВ [4, 6, 7].

Цель исследования — разработать способ идентификации бактерий вида *Acinetobacter nosocomialis* по совокупности фенотипических признаков с использованием признака уреазной активности.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Объектами исследования были 116 штаммов бактерий группы *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) и 2 штамма *Acinetobacter calcoaceticus*. Все клинические штаммы были выделены в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии в 2018–2019 гг., из них 85 штаммов *A. baumannii*, 10 штаммов *A. pittii*, 12 штаммов *A. nosocomialis*. Еще 9 штаммов *A. nosocomialis* были выделены нами из проб воды реки Невы. Два штамма *A. calcoaceticus* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, изолированных из цианобактериальных матов, были предоставлены д.м.н. Краевой Л.А. Видовая принадлежность всех указанных штаммов была идентифицирована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Все указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии.

Питательные среды и реактивы. Для культивирования бактерий использовали колумбийский агар (НИЦФ, Санкт-Петербург). Гемолитическую активность бактерий изучали на колумбийском агаре с 5% крови барана. Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода осуществляли на минимальном солевом агаре (г/л): $\text{NH}_4\text{Cl} - 5$;

NH_4NO_3 — 1; Na_2SO_4 — 2; K_2HPO_4 — 3; KH_2PO_4 — 1; MgSO_4 — 0,1; агар — 15; 1,6%-ный водный раствор бромтимолового синего — 4 мл, дистиллированная вода — 1 л; $\text{pH} = 7,2$; стерилизация при 121°C 20 мин. Каждый субстрат вносили по 0,1 г в отдельную колбу с 50 мл стерильной горячей среды, устанавливали $\text{pH} = 7,2$, в одну колбу субстрат не вносили (контроль среды), разливали в чашки Петри. Использовали следующие субстраты: этанол, L-арабиноза, D-декстроза, L-гистидин гидрохлорид, L-аргинина гидрохлорид, путресцина дигидрохлорид, трикарбаллиловая кислота (Sigma-Aldrich, Швейцария).

Отношение бактерий к окраске по Граму. Использовали тест тяжа с 3%-ным раствором КОН и/или микроскопию чистой культуры бактерий, окрашенных по методу Грама. Рост бактерий при 37 , 41 , 44°C изучали посевом суточных бульонных культур бактерий на сектора колумбийского агара с учетом результата через 48 ч. Наличие каталазы выявляли тестом с 3%-ным раствором пероксида водорода.

Тест на цитохромоксидазу бактерий. Несколько капель 1%-ного водного раствора тетраметилпарафенилендиамина (bioMerieux, Франция) наносили на фильтровальную бумагу в чашке Петри. Запаянным концом пастеровской пипетки отбирали часть колонии или газона исследуемых бактерий и наносили их на влажную бумагу с реактивом. Появление синей окраски комочка бактерий в течение до 20 секунд указывало на наличие цитохромоксидазы. Отсутствие окраски или появление ее в более поздние сроки указывало на отрицательный результат.

Методика определения нитратредуктазы бактерий [3]. Использовали питательную среду с 0,1% KNO_3 . Состав среды (г/л): пептон ферментативный — 0,5; NaCl — 0,5; KNO_3 — 0,1; вода дистиллированная — 100 мл; стерилизация при 121°C 20 мин. Вносили по 0,1 мл среды в лунки полимерного планшета, затем засеивали в лунки по 1 полной петле суточной агаровой культуры исследуемых бактерий, одну из лунок не засеивали (контроль среды). Посевы инкубировали при 37°C аэробно в течение 3 часов, после чего вносили в каждую лунку реактивы на нитриты — 0,05 мл 0,2%-ного водного раствора риванола, затем 0,05 мл 12%-ного раствора соляной кислоты (приготовленной из концентрированной 36,5%-ной соляной кислоты). Мгновенное появление красной окраски среды в лунке с посевом указывало на наличие нитратредуктазы бактерий, желтая окраска указывала на отсутствие нитратредуктазы, в контрольной среде без посева сохранялась желтая окраска реактива.

Методика пероксидводородного микрообъемного ОФ-теста для экспрессного (1 ч) определения окисления и ферментации глюкозы грамотрицательными бактериями [2]. Использовали

«Набор для определения ферментации и окисления глюкозы (ОФ-теста) пероксидводородным микрообъемным методом» (НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург), содержащий среду № 1 (для ферментации глюкозы) — 100 мл 1%-ного раствора D-глюкозы в фосфатно-буферной основе $\text{pH} = 7,6$ с индикатором фенол-рот и 5 мл пергидроля (30%-ный раствор пероксида водорода). Среду № 2 (для окисления глюкозы) готовили путем внесения 10 мл среды № 1 в отдельный флакон, добавления 0,2 мл пергидроля до 0,6%-ной конечной концентрации пероксида водорода. Среду № 2 использовали в течение 12 часов. В лунки полимерного планшета вносили отдельно по 0,1 мл среды № 1 (для ферментации глюкозы) и среды № 2 (для окисления глюкозы). Исследуемую культуру вносили полной петлей диаметром 2 мм (не платиновой) в лунку со средой № 1 и перемешивали. Таким же образом засеивали культуру в лунку со средой для окисления глюкозы, в которой при перемешивании наблюдается бурное выделение пузырьков газа (кислорода) вследствие действия каталазы бактерий на пероксид водорода в среде. Посевы инкубировали аэробно при 37°C в течение 1 ч. Изменение исходного красного цвета среды № 1 на желтый цвет означало ферментацию глюкозы; переход окраски в желтый цвет и газообразование в лунке со средой № 2 указывало на окисление глюкозы. Отсутствие изменения окраски среды в обеих лунках при газообразовании в среде № 2 указывало на отсутствие ферментации и окисления глюкозы. Контроль — те же среды без посева бактерий.

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

Методика определения уреазы быстрой активности микрообъемным методом в планшетах [1]. Использовали среду с мочевиной ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$) следующего состава: Na_2HPO_4 — 1,1 г; KH_2PO_4 — 1,1 г; NaCl — 5,0 г; 0,4%-ный воднощелочной раствор фенолового красного — 5 мл; мочевины (CAS no. 57-13-6) — 10,0–15,0 г; вода

дистиллированная — 1 л. Для приготовления среды ингредиенты, кроме мочевины, растворяли в 1 л дистиллированной воды, разливали по 50 мл во флаконы, стерилизовали 20 мин при 121°C, затем добавляли во флаконы по 0,5–0,75 г самостерилизованной мочевины. Прозрачную, желтой окраски среду использовали в течение 30 суток при хранении от 4°C до 8°C. Для постановки теста среду с мочевиной вносили по 0,1 мл в лунки стерильного полимерного планшета, суточную агаровую культуру исследуемых штаммов бактерий засеивали полной петлей диаметром 2 мм в лунку со средой и перемешивали. Таким же образом засеивали в отдельные лунки суточные культуры контрольных штаммов уреазопозитивного *A. nosocomialis* (положительный контроль) и уреазонегативного *A. baumannii* (отрицательный контроль), одну лунку со средой не засеивали (один контроль использовали для всех штаммов, исследуемых в данный день). Посевы выращивали аэробно при 37°C в течение 3 ч, после чего учитывали результат: изменение исходной желтой окраски среды на красную в лунке с посевом исследуемого штамма указывало на выявление уреазы быстрой активности при наличии такого же результата в лунке положительного контроля. В лунках отрицательного контроля без посева бактерий среда сохраняла исходную желтую окраску. Выявление уреазы после более длительной инкубации посевов указывало на наличие уреазы слабой активности.

Идентификация видов бактерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Масс-спектры образцов бактериальных клеток получали в линейном положительном режиме работы MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LRF (Bruker Daltonik, Германия). Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper RTC (Bruker Daltonik, Германия) путем сопоставления масс-спектров каждого исследуемого образца с данными эталонных спектров из таксономической базы и вычислением коэффициентов совпадения, представленных в виде оценок в баллах.

Методика статистической обработки. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Определение согласия между результатами идентификации *A. nosocomialis* методом с выявлением уреазы быстрой активности и методом MALDI-TOF масс-спектрометрии осуществляли анализом таблицы сопряженности 2 × 2 бинарных величин с вычислением критерия χ^2 с поправкой Йейтса.

Результаты

Изучение распределения штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по времени выявления уреазы микрообъемным методом при аэробном культивировании показало, что у всех 21 штаммов *A. nosocomialis* уреазы выявляется быстро — в течение 3 ч, преимущественно через 1–2 ч (табл. 1). У 15 из 85 штаммов *A. baumannii* уреазы была обнаружена через 24 ч культивирования и только у 1 штамма — через 2 ч (табл. 1). У всех 10 штаммов *A. pittii* уреазы не выявлена, у одного из двух штаммов *A. calcoaceticus* обнаружена через 18 ч (табл. 1). Всего имели уреазу 18±2,9% штаммов *A. baumannii* и 100% штаммов *A. nosocomialis*, при этом уреазы быстрой активности, выявляемую через 3 ч, имели 100% штаммов *A. nosocomialis* и только 1 штамм (1,17%) *A. baumannii* (табл. 2). Бактерии видов *A. pittii* и *A. calcoaceticus* не имели уреазы быстрой активности (табл. 2). Результаты были полностью воспроизводимы при трехкратных повторах. Определение уреазы микрообъемным методом в условиях ограничения доступа воздуха (культивирования посевов на среде с мочевиной под слоем вазелинового масла) выявило уреазу быстрой активности (через 3 ч) у 16 из 21 штамма *A. nosocomialis* (76,2±2,7%) и 1 штамма *A. baumannii*.

Все исследуемые штаммы ацинетобактеров были изучены фенотипическими тестами по указанной выше методике для выявления их принадлежности к группе *A. baumannii* (*Ab*). Было

Таблица 1. Распределение штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по времени выявления уреазы

Table 1. Time-dependent urease detection related to distribution of *A. baumannii* group (*Ab*) and *A. calcoaceticus* bacterial strains

Вид бактерий Bacterial species	Число штаммов Number of strains	Число выявленных штаммов с уреазой по интервалам времени, ч* Number of detected time-dependent urease-positive strains, hours*							
		0,5	1	2	3	4–6	7–9	10–17	18–24
<i>A. baumannii</i>	85	0	0	1	1	1	5	11	16
<i>A. nosocomialis</i>	21	2	13	19	21				
<i>A. pittii</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. calcoaceticus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	1

Примечание. * — суммарное число штаммов на каждом интервале учета.

Note.* — total number of stains at each checkup time point.

Таблица 2. Характеристика бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по уреазной активностиTable 2. Characteristics of *A. baumannii* group (*Ab*) and *A. calcoaceticus* bacteria by urease activity

Вид бактерий Bacterial species	Число штаммов Number of strains	Число штаммов с уреазной активностью Number of strains with urease activity			
		Общее количество Total quantity		Количество с уреазой быстрой активности* Quantity of rapid urease activity-positive strains*	
		n	%	n	%
<i>A. baumannii</i>	85	16	18,82±2,9	1	1,17
<i>A. nosocomialis</i>	21	21	100	21	100
<i>A. pittii</i>	10	0	0	0	0
<i>A. calcoaceticus</i>	2	1		0	0

Примечание. * — выявление уреазы за 3 ч.

Note.* — 3-hour urease detection.

установлено, что это неподвижные граммотрицательные кокковые бактерии, которые растут при 37, 41 и/или 44°C, не гемолизуют кровь барана, не имеют цитохромоксидазы и нитрат-редуктазы, но содержат каталазу; не ферментируют, но окисляют D-глюкозу, утилизируют этанол, L-арабинозу, L-аргинин, L-гистидин, путресцин, трикарбаллиловую кислоту, не утилизируют D-глюкозу. Штаммы *A. nosocomialis*, *A. pittii* имели одинаковые признаки по всем тестам. Среди штаммов *A. baumannii* выявлены варианты, утилизовавшие L-гистидин. Штамм *A. baumannii*, имевший уреазу быстрой активности, не утилизировал L-арабинозу.

Исследование методом MALDI-TOF масс-спектрометрии выявило принадлежность изученных штаммов к видам *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. calcoaceticus* с показателями баллов 2,05–2,85. Статистическая обработка результатов видовой идентификации 116 штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) по совокупности фенотипических тестов с применением теста на уреазу быстрой активности в сравнении с результатами видовой идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии показала, что чувствительность и специфичность идентификации штаммов вида *A. nosocomialis* составили 100 и 98,83% ($\chi^2 = 103,2$; $p < 0,0001$) соответственно.

Обсуждение

В данном исследовании впервые был обнаружен фенотипический признак, отличающий бактерии *A. nosocomialis* от других видов группы *Ab* (*A. baumannii*, *A. pittii*) и *A. calcoaceticus*. С 1991 г. надежную идентификацию этих видов фенотипическими тестами считали невозможной и лабораторную диагностику завершали определением группы *Ab* или комплекса ACB [6]. Этот признак — наличие уреазы быстрой активности, выявляемой в течение 3 ч, был обнаружен у всех штаммов *A. nosocomialis* (100%), одного штамма *A. baumannii* (1,17%) и отсутствовал у всех

изученных штаммов *A. pittii*, *A. calcoaceticus*. Следовательно, уреазы быстрой активности имеет таксономическое значение как маркер бактерий вида *A. nosocomialis*, отличающий этот вид от других видов группы *A. baumannii*.

Экспериментальным путем были оптимизированы состав среды с мочевиной и условия постановки теста на уреазу быстрой активности. При этом установлено, что оптимальной является постановка теста на уреазу микрообъемной технологией в условиях аэробного культивирования при 37°C в течение 3 ч. Методика постановки теста на уреазу изложена выше в разделе «Материалы и методы».

Для определения принадлежности исследуемых бактерий к группе *A. baumannii* (*Ab*) был установлен и апробирован минимальный набор тестов, изложенных в разделе «Материалы и методы», который позволял надежно идентифицировать бактерии группы *Ab* в течение 24–48 ч.

В ходе идентификации штаммов ацинетобактеров, выделенных нами летом 2019 г. из проб воды реки Невы, по совокупности фенотипических признаков бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и уреазы быстрой активности были выявлены 9 штаммов вида *A. nosocomialis*. Контрольная идентификация этих штаммов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии подтвердила принадлежность всех штаммов к виду *A. nosocomialis*, что указывает на надежность разработанного метода идентификации. На данный способ идентификации бактерий вида *A. nosocomialis* получен патент РФ на изобретение № 2712895 от 2020 г. [1].

Благодарности

Авторы благодарят врачей-бактериологов Горелову Г.В., Богословскую С.П. (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) и д.м.н. Краеву Л.А. (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера) за штаммы бактерий *Acinetobacter*, предоставленные для исследования.

Список литературы/References

1. Патент № 2712895 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Способ идентификации бактерий *Acinetobacter nosocomialis*: № 2019129885; заявлено 2019.09.23; опубликовано 2020.01.31 / Сиволодский Е.П. Патентообладатель: Сиволодский Евгений Петрович. 9 с. [Patent No. 2712895 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/04 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Bacterial method of identifying *Acinetobacter nosocomialis* bacteria. No. 2019129885; application: 2019.09.23; date of publication 2020.01.31 / Sivolodskij E.P. Proprietors: Sivolodskij Evgenij Petrovich. 9 p.]
2. Сиволодский Е.П. Пероксидводородный микрообъемный метод ОФ-теста: экспрессное определение окисления и ферментации глюкозы грамотрицательными бактериями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1991. № 1. С. 14–17. [Sivolodskii E.P. Hydrogen peroxide microvolume method of the of test the rapid determination of the oxidation and fermentation of glucose by gram-negative bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1991, no. 1, pp. 14–17. (In Russ.)]
3. Сиволодский Е.П., Кудакеев М.Т. Ускоренное определение нитратредуктазы неферментирующих грамотрицательных бактерий // Лабораторное дело. 1991. № 1. С. 61–63. [Sivolodskii E.P., Kudakaev M.T. Accelerated definition of nitrate reductase in non-fermentative gram-negative bacteria. *Laboratornoe delo = Laboratory Science*, 1991, no. 1, pp. 61–63. (In Russ.)]
4. Bouvet P.J., Grimont P.A. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1987, vol. 138, no. 2, pp. 569–578.
5. Espinal P., Seifert H., Dijkshoorn L., Vila J., Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 11, pp. 1097–1103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03696.x
6. Gerner-Smidt P., Tjernberg I., Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, vol. 29, no. 2, pp. 277–282. doi: 10.1128/JCM.29.2.277-282.1991
7. Nemeš A., Krizova L., Maixnerova M., Van der Reijden T.J., Deschaght P., Passet V., Venechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13 TU). *Res. Microbiol.*, 2011, vol. 162, pp. 393–404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006
8. Park G.N., Kang H.S., Kim H.R., Jung B.K., Kim D.H., Chang K.S. A comparison of genospecies of clinical isolates in the *Acinetobacter* spp. complex obtained from hospitalized patients in Busan, Korea. *Biomed. Sci. Letters*, 2019, vol. 25, no. 1, pp. 40–53. doi: 10.15616/bsl.2019.25.1.40
9. Sedo O., Nemeš A., Krizova L., Kacalova M., Zdrahal Z. Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2013, vol. 36, no. 8, pp. 572–578. doi: 10.1016/j.syapm.2013.08.001
10. Wang J., Ruan Z., Feng Y., Fu Y., Jiang Y., Wang H., Yu Y. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 8: e104882. doi: 10.1371/journal.pone.0104882

Авторы:

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

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

Authors:

Sivolodskii E.P., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Biological Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Поступила в редакцию 28.03.2020
Отправлена на доработку 14.04.2020
Принята к печати 24.05.2020

Received 28.03.2020
Revision received 14.04.2020
Accepted 24.05.2020

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

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

Размеры иллюстраций:

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

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

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

Плата за публикацию статей

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

Подготовка статей

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

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

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

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

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

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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Алаторцева Г.И.	530	Евстифеев В.В.	473	Маркина А.Н.	423	Тонких Ю.Л.	570
Алексеева А.Е.	506	Емельянова А.Н.	565	Мильман Б.Л.	463	Топорков А.В.	409
Алексеева Л.А.	433	Епифанцева Н.В.	565	Мурашева М.С.	549	Топтыгина А.П.	517
Андреев Ю.Ю.	517	Еремеев В.В.	473	Наврузова Л.Н.	517	Ушакова Н.Б.	497
Арзамасцева Л.Ю.	577	Железникова Г.Ф.	433	Нарвская О.В.	497	Ханин А.Л.	539
Архипова С.В.	539	Жирков А.А.	433	Нероев В.В.	530	Цветкова Е.В.	463
Ахременко Я.А.	585	Журавлев В.Ю.	497	Нестеренко Л.Н.	530	Цуканов В.В.	570
Беленик В.Д.	454	Захар Е.В.	556	Павлов В.В.	497	Чепанов С.В.	549
Белова Е.В.	423	Захарова И.Б.	409	Панин А.Л.	585	Чепрасов М.Ю.	585
Бокач О.М.	549	Злоказов М.Д.	577	Парилова О.В.	423	Чередова К.В.	463
Борисов А.Г.	454, 570	Зуева Е.В.	591	Перепелица С.А.	556	Шамова О.В.	463
Бруснигина Н.Ф.	506	Иванова Л.А.	577	Перминова Л.А.	556	Шепелькова Г.С.	473
Васютин А.В.	570	Исакова-Сивак И.Н.	463	Ржавичева О.С.	570	Эргешов А.Э.	473
Викторов Д.В.	409	Казанцева О.М.	539	Рыжман Н.Н.	577	Abdul Majid M.Sh.	447
Викторова И.Б.	539	Капустина Т.А.	423	Рябина М.В.	530	Abdul Rahim S.Sh.S.	447
Витковский Ю.А.	565	Коленчукова О.А.	570	Савченко А.А.	454, 570	Azhar Z.I.	447
Вязовая А.А.	497	Колоджиева В.В.	585	Самодова О.В.	523	Benamor J.	491
Гвоздев И.И.	570	Колосовская Е.Н.	577	Сарыгина А.П.	530	Bourkadi J.	491
Герасимова А.А.	497	Копейкин П.М.	463	Сельков С.А.	549	Chaoui I.	491
Гизатуллина Ю.С.	481	Краева Л.А.	585	Селькова М.С.	549	El Mzibri M.	491
Гончаров А.Е.	585	Кригер Е.А.	523	Сиволодский Е.П.	591	Ghazi H.F.	447
Гончаров Н.Е.	585	Кричевская Г.И.	530	Скрипченко Н.В.	433	Hassan M.R.	447
Гординская Н.А.	506	Кудрявцев И.В.	454	Смердова М.А.	517	Jeffree M.S.	447
Горелик Е.Ю.	433	Кузнецова М.В.	481	Соловьева Н.С.	497	Li H.Y.	447
Горчилова Е.Г.	570	Лебедева И.А.	497	Соломенный А.П.	585	Madrim M.F.	447
Григорьев С.Е.	585	Лухверчик Л.Н.	530	Степанян И.А.	556	Oudghiri A.	491
Гумилевская О.П.	577	Любимова А.В.	577	Сторожева К.В.	549	Taoudi S.	491
Дешева Ю.А.	463	Малеев В.В.	517	Сычев И.А.	463	Wan Ismail W.R.	447
Доценко В.В.	530	Мальцева Н.В.	539				

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активные формы кислорода	570	микробиологический мониторинг	585	фиброз печени	570
антибиотикорезистентность	409	множественная лекарственная		филогруппа	481
антинейраминидазные антитела	463	устойчивость	497	функциональная активность	570
антитела	517, 523, 530	нейроспецифические белки	433	хемилуминесценция	570
бактериальный вагиноз	549	нейтрофильные гранулоциты	570	хемокины	433
биоопленки	481, 585	неомицин	549	хламидийная инфекция	423
вагинит	549	неонатальные судороги	433	холодовые адаптации	585
вакцинация	517, 523, 577	неспецифическая адгезия	481	центральная серозная	
взрослые	517	новорожденные дети	577	хориоретинопатия	530
вирулентность	506, 585	орнидазол	549	цитокины	433, 549, 565
вирус гриппа А	463	острые кишечные инфекции	565	цитомегаловирус	530
вирусные белки	530	патогенез	423	экстремальные местообитания	585
возрастная макулярная		первичный иммунный ответ	517	Эльжина	549
дегенерация	530	персистенция хламидий	423	эпидемиология мелиоидоза	409
воспаление	565	плазмиды	506	эпилепсия	433
генотип	565	пневмония	409	эпилептический статус	433
генотип Beijing	497	полиморфизм	565	adults	447
гены адгезинов	481	порины	506	<i>Acinetobacter baumannii</i>	591
гетеросубтипический иммунный		послеоперационный период	454	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	591
ответ	463	предикция	539	Asia	447
гликолипопротеин	473	противохламидийный иммунитет	423	В-лимфоциты	454
детерминанты резистентности		профилактика	577	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	409
и патогенности	506	психотолерантные бактерии	585	CD23	454
дети	433	распространенный гнойный		children	447
иммунитет	423, 523, 577	перитонит	454	CTX-M-55	506
иммунный ответ	463	респираторный хламидиоз	423	CYD-TDV	447
иммунофенотипирование	454	сапозин D	473	Dengue vaccine	447
инфекции	549	селезенка	556	FIRES	433
инфекционный мононуклеоз	556	сепсис	409	IgA	539
искусственный ген	473	серопревалентность	523	IgE	539
исход заболевания	454, 539	серрации	585	IgG	539
кластер B0/W148	497	сиквенс-тип 23	506	IgM	539
кластер Central Asian/Russian	497	специфическая адгезия	481	IL-1 β T31C	565
кожный синдром	570	спленомегалия	556	IL-2 T330G	565
коинфекция ВИЧ/туберкулез	539	сполиготикирование	497	IS6110	491
корь	517, 523, 577	субклассы IgG	517	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	506
коэффициент массы селезенки	556	туберкулез	473	LAP-2	506
лабораторная диагностика	409	ультразвук	556	MIRU-VNTR	497
лентивирус	473	универсальная гриппозная		mycobacterial internal transcribed	
летальность	539	вакцина	463	spacer (MYITS)	491
линейные В-клеточные эпитопы	463	уреаза бактерий	591	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	491, 497
линейный иммуноанализ	530	уреаза высокой активности	591	<i>Opisthorchis felineus</i>	570
макрофаги	473	уропатогенные штаммы		pleural tuberculosis	491
масса селезенки	556	<i>Escherichia coli</i>	481	polymerase chain reaction	491
медицинские работники	523, 577	утилизация глюкозы	591	safety	447
мелиоидоз	409	фебрильные судороги	433	sIgA	539
местный иммунитет	549				

Иллюстрация к статье «Оценка патогенного потенциала серраций из криогенных местообитаний» (авторы: А.Е. Гончаров, А.П. Соломенный, А.Л. Панин, С.Е. Григорьев, М.Ю. Чепрасов, Я.А. Ахременко, В.В. Колоджиева, Н.Е. Гончаров, Л.А. Краева) (с. 585–590)

Illustration for the article “Assessing *Serratia* spp. pathogenic potential from cryogenic habitats” (authors: Goncharov A.E., Solomenny A.P., Panin A.L., Grigorjev S.E., Cheprasov M.Yu., Akhremenko Y.A., Kolodzhieva V.V., Goncharov N.E., Kraeva L.A.) (pp. 585–590)

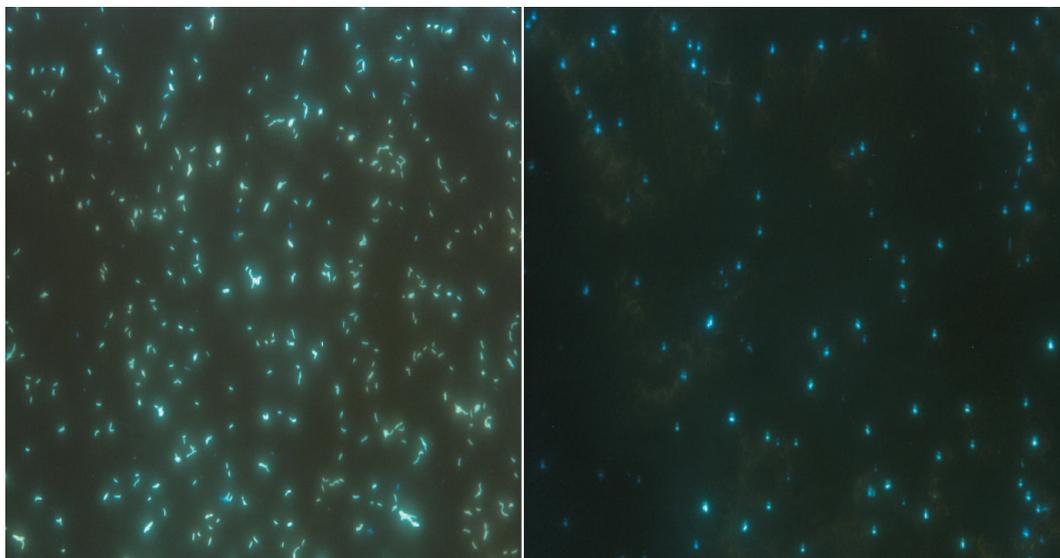


Рисунок. Флуоресцентная микроскопия биопленок, формируемых культурами серраций

Figure. Fluorescent microscopy of biofilms formed by cultures of *Serratia* spp.

Примечания. Слева — штамм *S. liquefaciens* 72, справа — штамм *S. fonticola* 5l. Окраска DAPI, увеличение ×400

Notes. Left: *S. liquefaciens* 72, right: *S. fonticola* 5l. DAPI staining, magnification ×400

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

